

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUOI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUJI SUYEVOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by
TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

A CONTRIBUTION TO THE BIOCHEMISTRY OF SEED GERMINATION WITH PARTICULAR REFERENCE TO ZEA MAYS.

By

R. C. MALHOTRA.

(Jammu, Kashmir, India.)

(Received for publication, June 19, 1933)

I. INTRODUCTION.

Chemical substances such as carbohydrates, fats and proteins are of great importance in germination on account of their concentrated accumulation, and because these alone are utilized until the seedlings are able to manufacture their own food. It is generally observed, as noted by Palladin (1930), in support of the exclusive use of the reserve materials during germination, that the dry weight of the seedlings is considerably less than the initial ungerminated seeds.

Besides the weight loss during germination, it has been shown by Malhotra (1931 iii) while working with fatty, starchy and proteineous seeds, that a unit weight of ungerminated seeds possesses more caloric energy than a similar unit of germinated ones. It was therefore realized by the writer that some inter-chemical changes of the molecular disintegration type must take place. This alteration of the molecular constitution may be responsible for the loss of heat energy during the course of germination. As far as the writer is concerned, the commonly accepted belief of Bonnier (1884, 1903, 1904) and Palladin (1930), actively advocated by a host of scientists, that germination is associated with the decrease of the reserve substances does not in itself alone satisfy the fate of these reserve materials.

In spite of the recognition, that food reserves decrease during the germination process, no attempt seems to have been made to follow their periodic decrease quantitatively. It is often asked,

“In which part, embryo or endosperm, do the biochemical changes take place? What is the nature of these changes?” No conclusive answer to these questions can be obtained from the Scientific literature, although it is an accepted and undisputed idea, based on old experiments, whose accuracy has many a time been challenged, that endosperm is a food storage organ from which a growing embryo usually obtains its nutrition.

Incidentally some data have been produced by Malhotra while working with enzymatic acceleration and retardation within embryo and endosperm, which seem to modify the idea expressed in the latter part of the last paragraph. It has also been shown that an embryo contains more fat than a similar unit of endosperm weight, which, of course contains more carbohydrates. Since a unit of fat can contribute more heat energy to an organ or to a growing seedling, it seems convincing and reasonable to assume that an embryo, as such, may also be of some nutritive importance in germination.

In order to determine the contribution of various seeds parts during germination, it was proposed to attempt experiments which may answer the following questions:—

(A) What are the periodic changes in chemical materials and caloric energy in seeds during the course of normal germination?

(B) What similar changes take place in embryo and endosperm during the course of germination of normal seeds?

(C) How are the reserve materials and calorific heat distributed in previously isolated embryos during their germination?

(D) What periodic changes take place in isolated endosperms kept in conditions commonly maintained during germination of seeds?

REVIEW OF LITERATURE.

Sachs (1887) thought, that during the germination of fatty seeds, starch is directly formed from the fat. He believed that this conversion is the first traceable step. According to him, subsequently, sugar arises from the starch. Thus in all seeds, the non-nitrogenous reserves travel as sugars from their storehouses to

the seat of growth. In his later views, he modified this idea, although he still supported the view of the transformation of fats into starch and sugars directly.

Sachs's, views, stated, above were soon after endorsed by Peters (1861), who analyzed fatty and pumpkin seeds. He showed, like Sachs, that starch is produced by the transformation of the fats.

Fleury (1865), while working with castor oil beans, rape and almond seeds denied the necessity of the occurrence of starch. He pointed out that sugar is to be found, as the fats disappear.

Hellreige (1880), agreed with this worker in denying the occurrence of starch.

Müntez (1871), pointed out that fats split into fatty acids and glycerine, although he did not actually demonstrate this. It was Schützenberger (1876), who actually found a ferment which would split oils into these components during germination. Green, and later Green and Jackson (1906), discovered this ferment postulated by the previous author. In addition, they noted that the appearance of starch is due to a secondary formation and not to translocation. Deleano (1909), referred to lipase activity, while Ross (1919) spoke of auto-digestion.

Timirazeff concluded that nutrient substances in the endosperm or cotyledons exist in solid form but later go out in solution.

Miss Eckerson (1913/1921), has studied physiological and chemical changes in seeds after ripening. She has shown that food is stored in the embryo in the form of fats. After their ripening, she noted a decrease in fats and the appearance of sugars.

Guppy (1912), obtained weights before and on reaching the germination point of some seeds. From his table, he concluded that when compared with their weights in the resting stage, seeds on being air dried after reaching the point of germination are heavier, others are lighter, while still others remain unchanged. In the light of recent work, these conclusions seem doubtful, because a part of the reserve materials is lost in the later stage from all kinds of seeds. Thus the weight of the resting or ungerminated

seeds should always be more than the germinated ones, when both are considered on air dry basis.

Maquenne (1918), studied the change in the composition of some seeds during germination. In his experiments fats were shown to decrease gradually. The carbohydrates, largely represented by celluloses, ash and the undetermined constituents increased in about the same proportion.

Schertz (1920), analyzed germinated and ungerminated seeds of Sudan grass. He found the greatest change in sugars. The decrease in sugar-like products was about 11.5 per cent, due to respiration. Crude fiber remained practically unchanged. Similar change was noted in other grasses. The data from the work done by Atkinson (1922), also shows that fats are transformed into sugars. His work was based on animals, namely, dogs.

It has been proposed by Schultze and Umlauft (1876), that the loss of materials during the germination of starchy seeds occurs through the loss of carbon, oxygen and hydrogen. Nitrogen and ash remained, unchanged. Contrary to this view, Laskovasky (1874), advocates that during the germination of fatty seeds the loss is due entirely to the loss of carbon and hydrogen. The amount of oxygen actually increased through absorption. The stored fats decreased during germination and were replaced by absorption of oxygen.

Bonnier (1905), suggests that during seed germination, in addition to respiration (which liberates heat), other chemical changes and dissociations of exothermic character occur in abundance. Similar views have been expressed by Palladin (1930). He definitely states, however, that the loss of seed weight in the course of germination is due to carbon, oxygen and hydrogen alone.

Earlier workers such as Sachs (1887), and Jost (1907), make suggestions similar to Palladin's, namely, that the quantity of proteineous substances are not diminished, while non-nitrogenous materials are wholly utilized in germinating seeds. According to Johnson (1904), organic substances stored within the seeds are utilized during germination.

Almost all text books on botany state that endosperm is the food storage organ of the seeds. This supplies nutrition. Over forty years ago Sachs (1887), recorded this: "The reserve materials are either deposited in the endosperm, from which the young plant absorbs its nutritive matters on germination; or the first two leaves of the seedlings, the so called cotyledons, themselves grow to an enormous size and become filled with reserve materials, which are then conveyed on germination forthwith into the tissues of the growing organs." Jost (1807), also expressed similar views in the following words, "The endosperm, however, a tissue external to the seedling (embryo) may be the seat of deposit of such reserves, which are assimilated by the enzymes."

Miss Choate (1921) observed the presence or absence of chemical materials in the coat, the endosperm and the embryo of wheat seeds during germination. She employed microchemical methods in her study. She concluded that the principal carbohydrate was stored in the form of starch and that it was present in the endosperm. In her experiments, sugar appeared in the embryo after 18 hours. Protein content of the endosperm, except for that of the aleurone layer, decreased gradually.

Miss Eckerson (1913), employing qualitative microchemical methods, found that in light sensitive seeds active hydrolysis of hemicelluloses, fats and proteins occurred in the endosperm (both in light and darkness). In light this process began towards the outside of the endosperm, and the resulting substances diffused out and away from the embryo. On the other hand, in the dark, hydrolysis originated near the embryo, which could then make use of the hydrolytic products.

Brown *et al.* (1890/1898); and Miss Brushi (1908) also recorded some chemical changes which they found in several seeds qualitatively. Their conclusions are more or less similar to that of Miss Choate's, whose work has already been reviewed above. For a comprehensive summary of the work on the biochemistry of germination done up to (1880), Detmer (1880) may be consulted.

From the review of the literature presented thus far, it may

seem evident that in spite of the convictions that an endosperm furnishes food to the seedling during germination, no specific quantitative proof has been presented. The rôle of embryo as a nutritive organ of the seed has been largely ignored.

MATERIAL AND METHODS.

A. Periodic Changes of Reserve Materials and Calorific Energy in Seeds During Germination.

Uniform seeds of maize, wheat and peas were obtained. Each kind was divided into five duplicate lots of 200 seeds (each sample) after Malhotra's procedure (1930/1931). The first duplicate portions were not treated in any way. It was assumed that the normal seeds would yield data showing the composition of the ungerminated seeds. The rest of the lots were germinated in separate petri dishes under uniform conditions following the technique previously developed by Malhotra (1930 i).

The seeds were allowed to germinate for 2, 4, 6 and 8 days. The partially germinated seeds (depending upon the time when germination of each lot was discontinued) were immediately heated for an hour to kill all the enzymes present (at 110°C), dried for 24 hours at 80°C , cooled to the laboratory temperature in desiccators, pulverized until all the powder obtained could pass through a 60-mesh screen. Such a degree of fineness of the plant products has been considered sufficient by the writer (1930 iii). The ungerminated seeds were also similarly treated. All analyses were undertaken in duplicate.

Fats (also some pigments) were extracted with petroleum ether in Soxhlet extraction apparatus. The process was continued for 38 hours. The writer (1931 ii) has shown experimentally the importance of petroleum ether rather than the employment of any other agent for the extraction of fats.

Sugars were extracted with 60 per cent ethyl alcohol and were determined by the Munson and Walker method employing potassium permanganate solution as recommended by Bertrand and as recorded by Mathews (1931). Starch was first reduced by

saliva. It has been shown by Gardner (1929) and others in their extensive experiments that the use of saliva is more satisfactory than any other agent employed for the digestion of starch. The sugars obtained from the digested starch were determined as before.

Hemicelluloses were first tested by Malhotra's (1930 ii), microchemical method and later determined quantitatively by the writer's method (1931 ii). Total nitrogen was estimated by Arnold-Gunning's modification of Kjeldhal's method as described by Mathews (1931). All the determinations were carried out in duplicate until agreement within 0.1 per cent was obtained.

There are various methods by means of which calories of heat can be measured. After preliminary trials it was soon realized that the ice calorimeter of Lavoisier and Laplace (1780), the respiration calorimeters of Dulong (1841), Depretz (1848) or one developed according to the lines of Regnault and Reiset (1849). Atwater, Rosa, Benedict (1903/04) and Capstick (1921), although excellent for use in animal physiology, were not satisfactory for this study.

Calories of heat were determined by the Parr Oxygen Bomb calorimeter following the directions and precautions laid down by Poole (1918), and the Central Scientific Company of Chicago. The calorimeter was placed in a room free from sudden changes in temperature and well protected from direct sunlight. A "Metastatic" thermometer with 0.02° divisions was used. Distilled water was used. It was kept till a constant temperature was attained. The readings were taken by means of a hand lens. Two to three grams of samples in duplicate were used. Each time an average of 15 readings was accepted as a unit.

The corrections for fused wire and nitrogen were calculated in the same way as was recorded in the previous work undertaken by the writer. The calorific values of the samples were calculated on the basis of one gram of air dry material.

The loss in weight during the course of germination was calculated by weighing the seeds or seedlings before and after their germination (both on air dry basis). Ash was estimated in

duplicate by completely burning the samples in an electric muffle until a constant weight was obtained.

B. Periodic Changes of Reserve Materials in Embryo and Endosperm (attached) During Germination.

It was soon realized that maize would be a good crop to use for this study, since the embryo could be easily separated from the endosperm; since the former is large in size and above all because of the writer's familiarity with these seeds both in the field and in the laboratory.

Uniform ears of Golden Banton maize were obtained from the Farmers' Union Co-operative Association, Saint Marys, Kansas. Their tips and butts were discarded for the reasons already suggested by Malhotra (1930 ii). The seeds were divided into five duplicate lots of 1,000 each. Except for the first duplicate lot, which was untreated, each portion was germinated, as indicated in A, for 2, 4, 8 and 10 days respectively. Embryos and endosperms were separated at the end of the specified germination periods. Ungerminated seeds were also handled in the same way as the germinated ones. The procedure of sampling analysis and calculation was the same as before, as is already mentioned in part A.

C. The Distribution of Reserve Materials and Heat Energy in Previously Isolated Embryos During the Course of Germination.

Maize seeds were obtained as before. Their embryos were dug out by a special knife made for this purpose. Every precaution was taken that the embryos should not be injured. A small amount of starch (a part of endosperm) left near the edges of the embryo after cutting it out was not removed, because in this operation it is very easy to damage the exposed embryo and hence to destroy or disturb its germinating capacity. Plate I shows typical endosperms and embryos during germination.

The isolated embryos were divided as before and except for one duplicate lot, which was kept as control, the remaining lots were germinated for 4, 6, 8 and 12 days. The same methods were



Photograph Showing A typical Maize Embryo and Endosperm Analyzed at Various Stages of Germination.

Upper Row Embryos; Lower Endosperms

From Right to Left: Ungerminated Embryos and Endosperms (Control), Germination After 2, 4, 8 and 10 Days.

followed in their germination, sampling, analysis and calculations, as was described before.

D. Periodic Changes in the Isolated Endosperms Kept in the Germinating Conditions.

The same procedure was followed as in part C, except that instead of isolated embryos, similar endosperms were employed. Strict germinating conditions were maintained, although it is obvious that endosperms alone do not germinate.

PRESENTATION OF DATA AND DISCUSSION.

A. Periodic Changes of Reserve Materials and Calorific Energy in Seeds During Germination.

The percentage of fats, dry weight, ash, sugars, starch, hemi-

celluloses, nitrogen and the calories of heat per m. weight during germination of maize, peas and wheat seeds have been presented in table I. It may be seen from column 2 that fats decreased in all seeds. Minimum diminution was reached after the eighth day of germination. Decrease of fats was not in the same proportion in all species of seeds used. Maize lost little in comparison with wheat and peas. It seems from the figures that there was a maximum drain on fats for about or a little over six days. During the early stages of germination, carbohydrates were utilized to a greater extent.

Column 4. represents ash. It would seem at first that ash increased during germination. This is true as far as the percentage is concerned. Really it did not increase since other reserve materials decreased (both on the percentage and on the absolute basis) while the ash did not. Thus, although ash appeared to have increased on the relative basis, actually it neither increased nor decreased. Furthermore, as an inorganic constituent of the seeds, if it takes part at all, it may be of a co-enzymatic type. As such it is recoverable by an analysis.

That no change actually took place in the ash content can be ascertained further from column 3. Peas lost most weight. Their ash appeared to have increased accordingly. Wheat decreased in weight next, and the ash in these seeds increased likewise; that is, less than that of the peas. The weight of maize was reduced least of all, and their ash increased correspondingly.

In all seeds used, fats decreased during germination. As the germination time increased, a greater quantity of fat was used up. The difference of loss in dry weight between seeds and seedlings was not very great. On the whole, it is directly related to the duration of germination, although no proportionality existed between the latter and the loss in weight.

Sugar has been recorded in column 5. In almost every case this substance increased during germination. On the other hand, starch (column 6) decreased, although no correlation existed between these two carbohydrates. Since it is well recognized that starch breaks down into sugars before it is assimilated by an

TABLE I.

Data Showing the Distribution of Some Reserve Materials and Heat Energy at Various Intervals During Germination of Peas, Wheat and Maize.

Kind of Seed and Treatment	Fats	Loss of Dry Weights	Ash	Sugars	Starch	Hemicelluloses	Nitrogen	Calories of Heat per Gram
1	2	3	4	5	6	7	8	9
PEAS								
Ungerminated	2.59	—	3.06	14.1	16.2	14.4	4.6	3.484
Germ. 2 days	2.24	11.4	3.46	19.2	7.4	9.7	2.5	3.468
„ 4 „	2.33	12.6	3.51	19.8	6.8	8.9	2.3	3.442
„ 6 „	2.21	20.7	3.73	19.7	6.4	8.6	1.1	3.432
„ 8 „	1.86	19.59	3.73	17.1	6.4	6.6	1.5	3.351
MAIZE								
Ungerminated	4.88	0.0	1.30	2.5	27.5	30.7	1.7	3.480
Germ. 2 days	4.71	10.8	1.42	5.2	23.2	19.9	1.5	3.458
„ 4 „	4.60	11.6	1.42	10.2	21.1	16.1	1.4	3.428
„ 6 „	4.40	11.3	1.45	8.6	20.0	11.6	1.2	3.414
„ 8 „	4.09	12.2	1.42	15.6	18.1	11.1	1.7	3.301
WHEAT								
Ungerminated	1.87	0.0	1.95	2.6	27.6	23.6	2.4	3.492
Germ. 2 days	1.87	11.3	2.05	7.4	21.7	22.0	2.3	3.449
„ 4 „	1.87	14.2	2.16	9.6	12.4	18.9	2.7	3.413
„ 6 „	1.81	14.9	2.16	8.1	10.8	18.1	2.1	3.351
„ 8 „	1.21	15.56	2.23	12.1	9.1	17.8	1.7	3.301

NOTE: All the figures, except those for calorific energy have been expressed in this and the following tables in percentages.

organism, this tendency on the part of these seeds, during this process, seems to be supported by these figures. Evidently in this process hydrolysis of starch (presumably by means of diastase) takes place faster than the rate of the assimilation of sugars, thus leaving the latter somewhat in excess.

Hemicelluloses (column 7) also decreased during germination. The maximum amount seems to have been utilized in maize, while wheat used the minimum. Our concept, commonly accepted, that

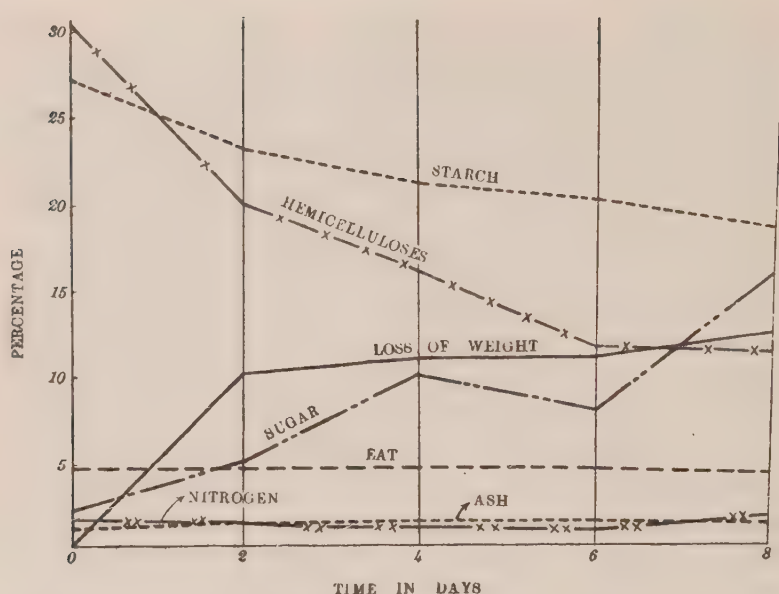


Fig. I. Periodic Distribution of Starch, Sugar, Fat, Ash, Hemicelluloses, Loss in Weight and Total Nitrogen in Maize Seeds During Germination.

hemicelluloses are inert substances and probably make up plant cell wall in combination with other materials may be regarded with some caution in face of these data. Recently Murneek (1929) and Malhotra have emphasized that under certain conditions hemicelluloses may act as active materials. This study seems to uphold the previous conclusions of Murneek and the writer.

Nitrogen (column 8), on the whole, did not seem to vary during germination. Peas showed an exception in this respect. Legumes, to which peas belong, predominate in proteins while corn and wheat contain more carbohydrates. It seems possible that because of the shortage of carbohydrates or rather active carbohydrates, peas may be able to make use of proteins. The writer is not yet in a position to explain the exceptional tendency of proteinaceous peas to use protein during germination, although according to several authors (as reviewed in the literature) and as shown by wheat and maize in this study, nitrogen is not generally

used in germination.

Calories of heat per gm. of seeds have been recorded in column 9. Maximum heat was found in wheat seeds. Peas and maize came next. The energy used during germination seemed to be very small. At the close of the eighth day, 60-80 per cent of the energy was still left. However a major portion of the heat derived from the remaining substances might not have been available for germination, because of the inert nature of the material left over.

Figure 1. illustrates the distribution of these reserve substances in maize seeds during germination.

B. Periodic Changes of Reserve Materials in Embryo and Endosperm (attached) During Germination.

Maize embryo and endospermic biochemical substances have been presented in table II. It seems (column 2) that maize embryo

TABLE II.
Date Showing the Periodic Distribution of Some Reserve Materials
(in percentages and Heat Energy (per gm.) in Embryos and
Endosperm During Maize Germination.

Part and Condition of Seed	Ash	Fats	Sugars	Starch	Hemi-celluloses	Total Nitrogen	Calories of Heat per Gram
1	2	3	4	5	6	7	8
ENDOSPERM							
Ungerminated	0.56	1.93	7.3	38.0	09.6	1.3	3.392
Germ. 2 days	0.56	1.40	13.2	36.2	13.9	1.7	3.352
" 4 "	0.47	1.38	4.2	34.4	10.0	1.1	3.314
" 8 "	1.03	1.15	9.1	26.2	9.5	1.7	3.302
" 10 "	0.80	1.56	6.0	20.8	9.0	1.5	3.280
EMBRYO							
Ungerminated	8.74	30.0	14.8	5.5	10.8	3.7	4.415
Germ. 2 days	11.99	28.81	13.4	4.7	10.5	3.5	4.350
" 4 "	9.13	27.23	8.9	4.7	10.7	3.5	4.034
" 8 "	9.92	19.0	13.0	4.8	10.4	2.8	4.005
" 10 "	8.37	17.1	12.8	4.4	9.3	2.4	3.968

contains more ash than does endosperm. At times, during the course of germination, the embryo contained twenty-two times as much ash, but the fraction of the ash is very small, and this may involve a considerable experimental error. Even then it may be concluded from these data that it neither increased nor decreased in the endosperm during germination of maize. On the other hand, ash increased in the embryo on the second day of germination, then decreased, and finally increased again to the approximate value of the untreated embryo (considering the experimental value). Thus it seems that up to the final stage of germination, inorganic substances (taken as ash in this particular case) were not utilized either by the embryo or the endosperm.

The embryo contained more fat than did the endosperm (column 3). With increasing duration of germination, it seemed to increase in the endosperm, while at the same time it decreased in embryo. Evidently a certain amount passed from embryo to endosperm—probably through the scutellum layer. Yet the amount transferred did not make up the difference. Thus a part was either used up directly or indirectly in germination or was transferred into some other chemical ingredient. The latter view does not very well agree with the known facts, because all other substances studied also decreased, and these should have increased if fats were used as their base.

Sugars (column 4) did not show any uniform increase or decrease, although they diminished somewhat after the tenth day of germination. This happened in both the tissues. The presence of sugars, as already explained, depends on the relative rate of hydrolysis of higher carbohydrates and the utilization and assimilation of the hydrolytic materials by the growing organism in some or all processes—in this case during germination. Thus the total amount of carbohydrates rather than the sugars alone should be of greater significance in this connection.

Starch was present in a large amount in maize endosperm while there was comparatively little of it in embryo. It seems from the figures that there was a gradual but progressive decrease in starch in the endosperm until about 48 per cent disappeared on

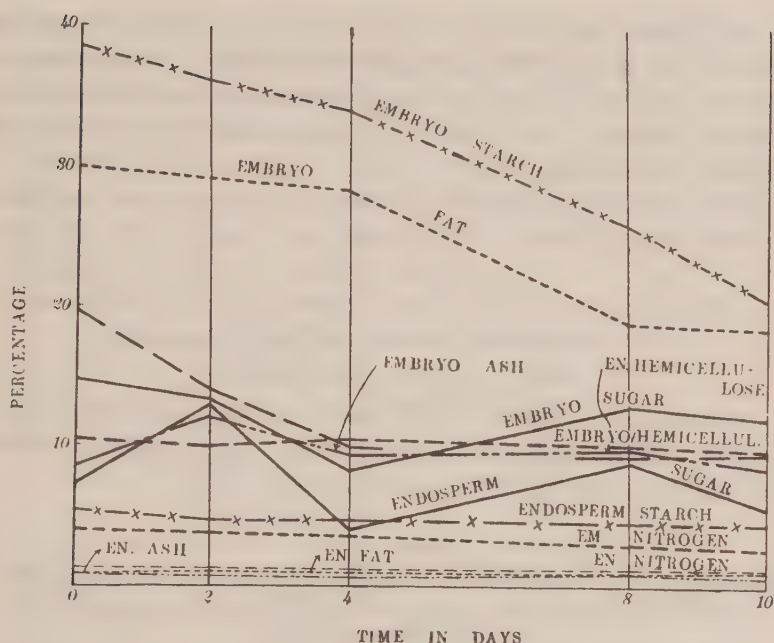


Fig. II. Periodic Distribution of Fats, Sugar, Ash, Total Nitrogen and Various Fractions of Carbohydrates in the Attached Embryos and Endosperms of Maize Seeds During Their Germination.

the 10th day. The embryo lost very little.

Hemicelluloses (column 6) were also predominating in endosperm. These gradually decreased during germination until approximately 52 per cent of them were used from the endosperm and about 10 per cent from embryo at the close of the germination.

Total nitrogen (column 7) decreased somewhat in the embryo and increased correspondingly in endosperm. It may be pointed out that the latter weighed about four times the former. Thus the total nitrogen remained within the two portions of the seed. It seems safe to infer that nitrogen was not used during germination but only had a free capacity to travel from one portion to another.

A gram of embryo contained more calories of heat than a gram of endosperm (column 8). This would be expected because

of the predominance of fats in the embryo. However, an embryo of maize lost more calories per gm. weight than did an endosperm. Although this fall in the heat energy did not run parallel with the decrease of fats in that tissue, yet there appeared to be a direct similarity between the two.

The periodic distribution of these reserve substances has been shown in the figures.

C. The Distribution of Reserve Materials and Heat Energy in the Previously Isolated Embryos During the Course of Their Germination.

The periodic analyses of the reserve materials (in percentages and on dry basis) and heat energy per gm. of the embryos in their various stages have been shown in table III.

TABLE III.
Data Showing the Distribution of Some Reserve Substances (in percentages) and Heat Energy (per gram) During Germination in Previously Isolated Maize Embryos.

Embryo treatment	Fats	Ash	Nitrogen	Sugars	Starch	Hemicelluloses	Calories of Heat per Gram
1	2	3	4	5	6	7	8
Ungerminated	28.5	8.7	2.4	15.6	21.0	16.7	4.350
Germ. 4 days	21.5	6.8	3.0	17.2	32.7	16.4	3.920
" 6 "	15.7	8.0	5.1	18.3	28.2	14.0	3.749
" 8 "	10.4	7.5	5.6	18.9	24.6	13.1	3.682
" 12 "	8.0	9.1	2.1	26.4	3.8	11.3	3.207

Ungerminated maize embryo possessed a high percentage of fat (column 2), which gradually decreased up to the end of germination. Approximately 73 per cent of the fat seemed to have been consumed during this process. There is no proof in the scientific literature that fat as such can be consumed (assimilated) by plants or by seeds. On the other hand, there are ample suggestions in plant, animal and chemical work which show that fats can

be transformed into carbohydrates. In this respect plants and animals behave similarly. Exact work on animals has already been reviewed in the literature above.

Although ash (column 3) appeared to have increased by about 4 per cent at the close of the germination (because of the greater decrease in the organic reserve materials) it did not increase actually. The details have already been stated previously while discussing the ash in a general way.

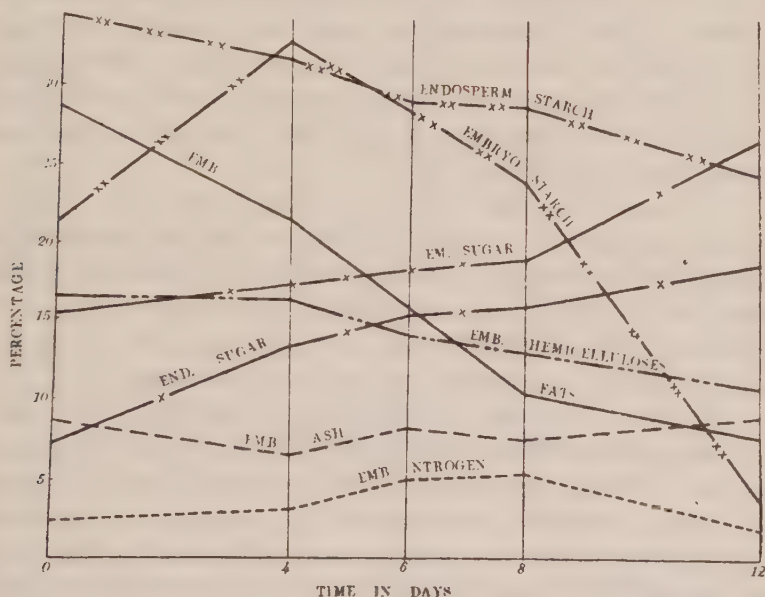


Fig. III. Periodic Distribution of Starch, Sugars, Fats, Hemicelluloses, Total Nitrogen, and Ash in the Isolated Embryos. Since The Isolated Endosperms did not Show Change in any Other Chemical Constituents Other Than Sugars and Starch, Only These Two Constituents have Been Plotted.

Nitrogen (column 4) increased at first and finally decreased to about the same value as that present in the ungerminated embryo. It seems probable from the data that between the fourth and the fifth day the carbohydrates or the fats might have been transformed into proteins. Similar data have been obtained by Yocum (1925), who writes thus: "Nitrogen is transformed

rapidly in the three-day seeding (wheat); after that the percentage remains constant." Additional nitrogen for the protein formation might have been fixed by the seedlings from the atmosphere. Several workers have shown that nitrogen can be fixed by plants other than the legumes, also (from the atmosphere).

On comparing the figures for sugars and starch with those of the ungerminated embryos which were attached and were used in the previous experiments (part B, table 2, columns 4 and 5), it seems evident that these figures are higher in the former than in the latter. This is because all the starch and possibly some sugar could not be removed from the edges of the embryo. Then again there might have been some difference because of the variation of the embryos themselves, in spite of all the precautions taken and because of the experimental error.

On the whole, sugars (column 5) increased in the isolated embryos while starch (column 6) decreased. It has already been stressed that increase in the sugar content during germination may depend on the relative rate of hydrolysis and the utilization of its products. In this case starch also increased up to the eighth day of germination after which it dropped very suddenly.

The figures for starch and sugar relationship are very interesting because they seem to indicate the chemical changes which may be going on within the isolated embryo. At this time (4-8 days) all reserve substances increased with the exception of fats and hemicelluloses, which decreased. One would not expect fats and hemicelluloses to be transformed into lower carbohydrates (starch and sugars).

At the same time heat energy decreased. It may be noted that the amount of fats decreased in this period. The writer is not aware of any work which has shown such a molecular transformation of fats into sugars and starch during germination, although the reverse has been indicated in conifers during the winter months. On the twelfth day of germination, 59 per cent of starch was used up. This tendency is in agreement with that shown by Spoehr (1919) who remarks thus: "Fats are important especially in the development of the seedlings."

Hemicelluloses (column 7) were somewhat higher in the ungerminated embryos. These decreased gradually and on the twelfth day of germination approximately 33 per cent of them were consumed. This particular behaviour of the hemicelluloses will be presented later in a study of "Polysaccharides."

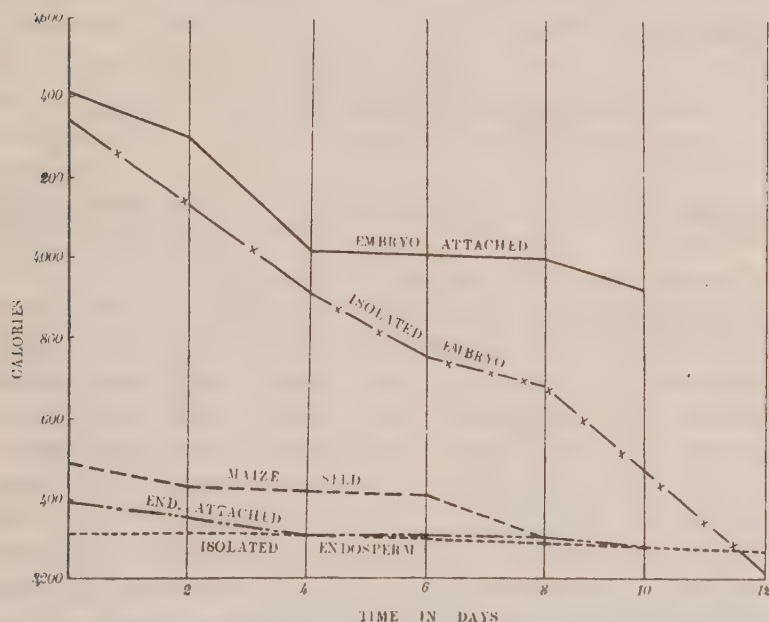


Fig. IV. Periodic Distribution of Energy in Terms of Calories in Maize Seeds, Attached Embryos and Endosperms and Isolated Embryos and Endosperms During Germination.

The heat calories (column 8) also decreased during germination. On comparing the heat values of these ungerminated embryos with those used in the previous experiment, (refer to table 2, column 8, of part B), it must be noted that the former contained less heat value than the latter. It may be because of the presence of a comparatively higher sugar and starch content and of a lower fat content in the former. Physical Chemistry has shown that a unit mass of fat contains more energy than a similar unit of carbohydrates.

*D. Periodic Changes in Isolated Endosperms During Germination
With Reference to their Relative Reserve Materials
and Heat Energy per Gram.*

Data for periodic changes in maize endosperm reserve materials have been shown in table IV. These data show that fats (column 2) and ash (column 3) remained practically constant.

TABLE IV.
Data Showing Changes in Reserve Materials in Previously
Isolated Maize Endosperm.

Treatment of Endosperm	Fats	Ash	Nitro- gen	Sugars	Starch	Hemi- cellu- loses	Calories of Heat per Gram
1	2	3	4	5	6	7	8
Ungerminated	1.1	0.60	1.3	7.0	38.8	19.2	3.327
Germ. 4 days	1.0	0.61	1.3	13.2	31.6	19.1	3.311
" 6 "	0.98	0.60	1.3	15.4	29.1	19.2	3.300
" 8 "	0.95	0.60	1.3	15.9	28.4	19.0	3.279
" 12 "	0.92	0.59	1.1	18.8	24.7	19.0	3.262

Sugar (column 5) increased while starch (column 6) decreased throughout. There appears to be an inverse relationship between these two members of the carbohydrate substances. In spite of this relationship between decrease in starch and increase in sugar, all the transformation could not be determined. In other words, if the initial sugar and starch of endosperm be added with that kept under the germination condition, a gradual decline seems to be evident. Since these figures have a definite trend, they cannot be attributed entirely to an experimental error. The writer is inclined to think, that all starch has been transformed into sugar. The loss has occurred in sugar fraction, because some part has been used in respiration. It has been shown and confirmed by two different workers that even dried leaves exhibit a measureable respiration. Thus it is conceivable that maize endosperm alone may also have respired. Then, too, since the difference between

the initial and the final sugar plus starch is very small, even if the endosperm *respired* at all, the velocity of respiration would have been extremely slow. The writer hopes to devote full attention to this question in the near future. Evidently endosperm starch splits into sugars by means of enzymes which are present in this tissue.

It seems that maize endosperm is self-sufficient in changing starch into sugars, although this change takes place at a slower rate. Shall we, therefore, conclude, that parts other than the embryo, at least maize endosperm, contain diastase or some similar enzyme?

Hemicelluloses (column 7) and nitrogen (column 4) remained practically constant.

The periodic distribution of biochemical reserves studied have been illustrated in the table. Since hardly any change has taken place in ash, nitrogen and hemicelluloses, these substances have been excluded from the table.

The calories of heat per gm. of endosperm have somewhat decreased from the initial to the final stage. At the same time starch and sugars have also decreased. It has already been suggested that this decrease may be due to respiration. When a large molecule splits into two or more smaller molecules it liberates heat. On the other hand, when two or more smaller molecules combine to form a large molecule energy is taken up. Since in these tissues the sugar fraction (comparatively small molecule) has constantly increased at the expense of starch (rather large molecule), some energy must have been liberated in the molecular transformation. Hence some decrease in the calorific energy of maize endosperm was noted at the close of the twelfth day.

SUMMARY.

1. An attempt was made to study the periodic quantitative changes in peas, maize and wheat during germination with particular reference to some biochemical substances and calorific energy. It seems that starch and hemicelluloses were utilized most, although fats were also consumed somewhat. Proteins were employed only

in peas, a leguminous crop. Sugars increased during germination, probably because of the breakdown of active polysaccharides exceeding their utilization. There was also a gradual decrease in calories per unit weight. Seedlings always weighed less than the initial weight of their seeds.

2. The study of changes in the reserve materials in attached embryo and endosperm of maize seems to indicate that, during germination, fats and heat energy decreased most in the embryo, although carbohydrates decreased also to some extent. In the endosperm, starch and hemicelluloses were used mostly. Sugars did not show any definite trend. The embryo contained higher percentage of ash and nitrogen. Both these substances, however, were unutilized by the growing seedlings.

3. Maize embryos were previously isolated from their endosperms. These isolated embryos were then allowed to germinate. Their chemical analyses seem to indicate that fats, starch and hemicelluloses, as well as calories of heat, decreased during germination, while sugars did not behave in any definite way. Ash and nitrogen (although fluctuations occurred between the fourth and the eighth day of germination) remained approximately constant at the last day.

4. Isolated maize endosperms kept under the conditions suitable for seed germination showed change only in sugars and starch. The former increased while the latter decreased. It was due possibly to the hydrolysis of starch by means of enzymes. There was also some decrease in calorific energy on account of the liberation of some energy which takes place when a large molecule like starch splits into smaller molecules of sugar. There was no change in hemicelluloses, nitrogen and ash and extremely little change was noted in fats. Some respiration may be responsible for carbohydrate loss, although endosperm as such is not capable of growth.

5. The significance of the changes in reserve materials and their applicability in seed, endosperm and embryo have been pointed out in the body of the text.

ACKNOWLEDGEMENT.

It is a pleasant duty to thank the writer's former colleague, Professor Hugh S. Carroll, Department of Chemistry, Saint Marys College, U.S.A. for the use of calorimeter. He is also indebted to Professor Walter Stiles, F.R.S. of Birmingham University, England, for reading the MS. Assistance rendered by Mr. Ray Glynn, formerly the writer's Assistant at Saint Marys, U.S.A., is hereby acknowledged. Messrs. James Kelly and Mike Fritz, formerly also of the same institution, deserve credit in connection with some routine work. Thanks are due also to the manager of the Farmers' Union Association, Saint Marys, for supplying maize ears.

REFERENCES.

- Atkinson, H. V. (1922): The transformation of proteins into fats and fats into carbohydrates in the body. *Jour. Metabolic Res.*, **1**, 565-607.
- Bonnier, J. (1905): Quoted from Pfeffer's *Physiology of Plants*. Trans. by Ewart, **3**, Oxford University Press.
- Benedict, F. G. and Miller, R. D. (1903/04): Experiments on the metabolism of matter and energy in the human body. *U.S. Dept. Agr., Bul.*, **175**.
- Bonnier, G. and Mangin, L. (1884): Recherches sur la respiration des tissus sans chlorophylle. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, **6**, 293-382.
- Bown, H. T. and Escombe, F. (1898): *Proc. Roy. Soc. London*, **63**, 3-11, 1898.
- Bown, H. T. and Morris, G. H. (1890): *Jour. Chem. Soc.*, **57**, 458.
- Bruschi, Diana (Miss) (1908): *Ann. Bot.*, **22**, 448.
- Capstick, J. W. (1921): A calorimeter for use with large animals. *Jour. Agr. Sci.*, **11**, 408-431.
- Choate, Helen, A. (Miss) (1921): *Bot. Gaz.* **71**, 409-13.
- Deleano, N. T. (1909): Recherches chimiques sur la germination. *Centibl. Bakt.*, **22**, 130-147.
- Depretz (1848): Measuring of heat. *Ann. Chim. et de Phys.* (2), **25**, 337.
- Detmer, W. (18803: Vergleichende physiologie des keimungsprocesses der samen. Jena.
- Dulong, M. (1841): Lettre adressé M. Despretz à MM les rédacteurs. *Ann. de Chem. et de Phy.* (3), **1**, 319-321.
- Dulong, M. (1921): Quoted from *Bot. Gaz.*, **71**, 409.
- Eckerson, Sophia H. (1913): A physiological and chemical study of after ripening. *Bot. Gaz.*, **55**, 286-299.

- Fleury, G. (1865): Recherches chimiques sur la germination. Ann. de Chem. Ser. 4, 4, 38-65.
- Gardner, F. E. (1929): Composition and growth initiation of dormant Bartlett pear shoots as influenced by temperature. Ph. D. thesis submitted to the faculty of the University of California; also Plant Physiol., 4, 405-434.
- Green, J. R. and Jackson, H. (1906): Further observations on the germination of castor-oil beans (*Ricinus communis*). Proc. Roy. Soc. London, 77 B: 69-85.
- Guppy, H. B. (1912): Studies in seeds and fruits. Williams and Norgate, London.
- Hellriegel, V. (1880): Vergleichende Physiologie des Keimungsprocessus der Samen. Jena.
- Johnson, S. W. (1904): How plants grow? Orange Judd, New York.
- Jost, I. (1907): Plant Physiology. Trans. by R. J. H. Gibson. Oxford University Press.
- Laskovsky, N. (1974): Die Keimung der Kürbissamen in chemischer beziehung, Moscow.
- Lavoisier et Laplace. (1780): Sur la chaleur. Histoire et Mémoires de l'Acad. de Sci., Paris, 355.
- Malhotra, R. C. (1930 i): A new method of germination and the influence of hydrogen-ion concentration on the germination and growth of *Helianthus annuus* and *Lycopersicum esculentum*. Jour. Ind. Bot. Soc., 9, 218-239.
- (1930 ii): Notes on the germination of *Zea mays*. Amer. Midland Naturalist, 12, 122-123.
- (1931 i): Selection of maize for germination and other tests. Nature, 127, 382.
- (1930 iii): Effect of the degree of pulverization and the weight of samples on the quantitative determination of some chemical constituents with particular reference to plant tissues. Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed., 2, 398-401.
- (1931 ii): Changes in plants during low temperature. Part I. Oil synthesis at various elevations of the Himalayas and its physiological influence on the protoplasm of *Cedrus deodara*. Jour. Ind. Bot. Soc., 10, 293-310.
- Some study of plant enzymes. Unpublished yet.
- (1931 iii): A physio-chemical study of some economic seeds with particular reference to weight and energy loss. Protoplasma, Berlin, 12, 167-189.
- (1930 iv): Microchemical study of hemicellulose in some plant cells with particular reference to its distribution in the protoplasm. Jour. Biochem., 12, 341-249.
- (1931 v): Notes on the determination of hemicelluloses. Jour.

Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed., **3**, 161-162.

— Unpublished data. In press.

- Maquenne, M. L. (1918): *Chimie végétale. Sur les changements de composition qui éprouvent les grains oléagineux au cours de la germination.* C. R. Acad. Sci., Paris, **127**, 625-628.
- Mathews, A. P. (1931): *Physiological Chemistry*, William Wood and Co., New York.
- Müntz, A. (1871): *Sur la germination des graines oléagineuses.* Ann. Chem., **22**-485.
- Murreek, A. E. (1929): *Hemicellulose as a storage carbohydrate in woody plants with special reference to apple.* Plant Physiol., **4**, 251-264.
- Palladin, V. I. (1930): *Plant Physiology.* Trans. by B. E. Livingston; P. Blackiston and Co. Philadelphia.
- Peters, E. (1861): *Kurzer bericht über bemerkenswerte untersuchungen auf dem gebiete der agriculturchemie vom jahre 1860.* Landw. Versuch., **3**, 82-168.
- Poole, H. (1918): *The calorific power of fuels.* John Wiley, New York.
- Regnault et Reiset. (1849): *Calorimeter.* Ann. Chem. et Phy., Paris, (3) **26**, 26.
- Rose, R. C. (1919): *After ripening and germination of seeds of Lilia, Sambucus and Rubus.* Bot. Gaz., **67**, 281-308.
- Sachs, J. (1887): *Lectures on the Physiology of Plants.* Trans. by H. M. Ward, Oxford University Press.
- (1890): Quoted from Green, J. R. (1890): *On the germination of castor-oil bean plant.* Proc. Roy. Soc. London, **48**, 370-372.
- Schertz, F. M. (1920): *A chemical analysis of Sudan grass seeds.* Bot. Gaz. **69**, 72-82.
- Schulze, E. and Umlauf, A. (1876): *Untersuchungen über einige chemische Vorgänge bei der keimung der gelben Lupine.* Landw. Jahrb., **5**, 821-868.
- Schützenberger. *On fermentation.* (1876): Inter. Sci. Ser., **20**: 88, 1876.
- Spoeck, H. A. (1919): *Economy of Cactus.* Carnegie. Inst. Washington Pub., **280**.
- Timirazeff, C. A. *The Life of plant.* Eng. Trans. by Miss Anna Chéréméteff, Longmans Green and Co., London.
- Yocum, L. E. (1925): *Jour. Agr. Res., U.S.D.A.,* **31**, 727.

A CONTRIBUTION TO THE BIOCHEMISTRY OF THE WHEAT PLANT.

By

R. C. MALHOTRA.

(Jammu, Kashmir, India.)

(Received for publication, June 19, 1933)

INTRODUCTION.

A study of the biochemistry of the growing wheat plant is desirable so that its various crude substances may be turned into finished products to better advantage. The present article is a preliminary report in this connection.

Although (Woodman and Engledow 1924; Brenchley et. al. 1908; and Thatcher 1915), studied the composition of wheat grain, they did not include straw. Lawes and Gilbert (1884) have shown that during the early stages of wheat growth, more nitrogen is used up, while later more carbohydrates are accumulated. Miss Eckerson (1917) found high ash content in the young plants.

Redzie (1894) found that the higher the crude protein in wheat straw, the lower the crude fiber and the greater the feeding value. Lyon (1905) stated that a young plant takes in a greater portion of nitrogen which is used in building up a kernel in its early development.

Yocum (1925) claims that a 3-day seedling used in his experiments rapidly translocated nitrogen. He also mentioned that hemicelluloses were of no importance. Newton and Brown (1926) found reduction in moisture and increase in sugar in hard wheat varieties.

Hopper and Nesbett (1930) came also to the same conclusion as that arrived at by Newton and Brown (*loc. cit.*). However they used hay grasses in their study. Dustman and Shriver (1931) concluded that proteins, carbohydrates and ash

ran high and fiber low towards blooming time in the plants of their experiments.

EXPERIMENTAL.

Hard winter wheat was sown on September 25, 1930, on a farm near St. Marys College, Saint Marys, U.S.A. From about a month later, twice every month, duplicate samples of the whole plants were analysed up to May 31, 1931. They were cut to the ground line and immediately put into Mason jars. On May 15 and 31, the spikes and the rest of the plants were separately analyzed because of the grain development at that time.

The samples were heated at 110°C for one hour to kill the enzymes. Later they were dried at 80°C for 26 hours. Their moisture was determined. They were ground and pulverized to 60-meshes.

Oils and fats were determined by extracting the samples with petroleic ether. The residue was extracted with 80 per cent ethyl alcohol and the sugars so obtained were analysed by Munson and Walkers' method. This procedure has been stated in details in Mathews (1930).

The residue left after sugar extraction was boiled to paste, 10 cc. of saliva added and the starch was reduced to sugar, which was tested as before.

Hemicelluloses were determined by Malhotra's (1931) methods. Pentosane were not analysed, as Malhotra (1931) showed their relationship with hemicelluloses. Total nitrogen was estimated by Arnold-Grunnings' modification of Kjeldahl's method.

DISCUSSION.

Various chemical materials studied have been shown in table I. The data show that during the young stages of wheat plants the moisture content was lower. During the seedling stage the temperature was low. At the time of maturity the water content decreased a great deal. Figure 1 shows water content of wheat at various stages of development.



Fig. I. Periodic Distribution of Moisture in Wheat Plant.

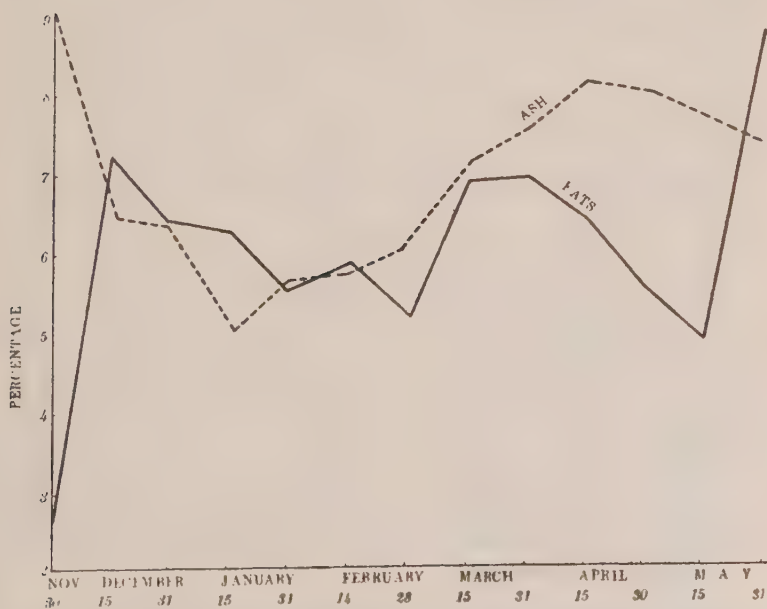


Fig. II. Periodic Distribution of Ash and Fats in Wheat Plant.

Oils did not show any definite trend, although at the time of grain development they were maximum. Ash was highest from the seedling stage up to the end of November, after which it decreased up to February 14 and then went up till the end of April. Figure 2 illustrates the distribution of ash and fats.

Sugar was minimum in the early stages. It increased and then decreased during the later stage. Column 6 shows the apportionment of starch during the wheat growth. Hemicelluloses were at the minimum at first but constantly increased up to April 15, after which they decreased. Malhotra (1930) has already suggested that hemicelluloses are not only cell wall constituents but are also present in the protoplasm.

TABLE I.
The Chemical Analysis of Hard Winter Wheat Plant at
Various Stages of Growth.

Date of Sampling	Water content	Oils & Fats	Ash	Sugars	Starch	Hemi-celluloses	Total Nitrogen
1	2	3	4	5	6	7	8
Nov. 30, '30	79.8	2.63	9.30	8.8	5.0	10.0	1.60
Dec. 15, "	74.6	7.19	6.39	12.0	3.6	10.2	0.74
" 31, "	73.8	6.38	6.34	20.9	5.8	10.3	0.84
Jan. 15, '31	72.1	6.24	5.07	30.3	2.8	17.2	0.27
" 31, "	70.6	5.50	5.63	23.0	3.8	17.8	0.40
Feb. 14, "	70.7	5.84	5.88	25.2	—	17.2	0.63
" 28, "	72.0	5.19	6.17	32.7	1.8	18.5	1.90
Mar. 15, "	79.2	6.80	7.15	36.4	—	32.8	1.50
" 31, "	80.7	6.84	7.6	40.8	—	40.3	2.90
Apr. 15, "	78.5	6.41	8.14	40.3	—	48.2	2.50
" 30, "	80.4	5.60	8.02	26.3	—	22.3	5.50
May 15, "	77.2	4.90	7.70	34.2	—	16.1	4.60
" 31, "	71.5	8.80	6.4	34.2	—	19.8	4.60

NOTE: All figures are based on the dry basis and have been expressed in terms of percentages.

Total nitrogen was minimum during the earlier stages, but it increased gradually up to the end of April. After April, some

protein was translocated to the head for grain development. The distribution of sugar, starch, hemicelluloses and total nitrogen have been illustrated in figure 3.

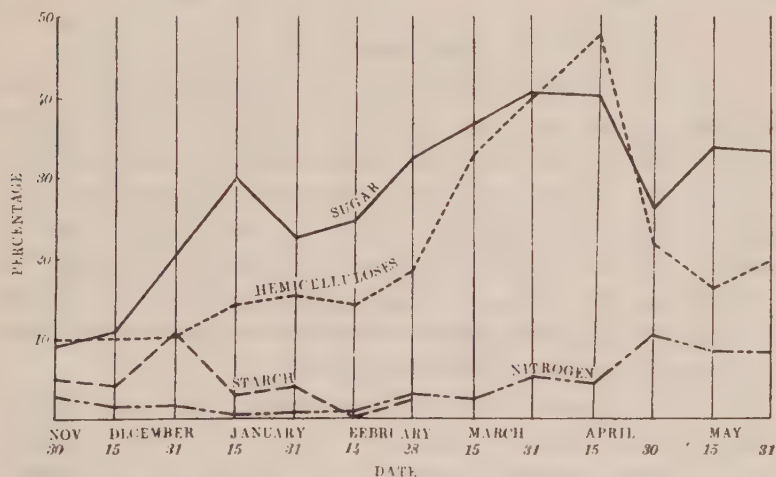


Fig. III. Periodic Distribution of Sugar, Starch, Hemicelluloses and Total Nitrogen in Wheat Plant.

The Chemical Composition of Wheat Grain on May 31 and June 15, 1931.

The analysis for wheat grain have been shown in table II.

TABLE II.
Chemical Composition of Hard Wheat Grain
On May 31 and June 15, 1931.

Name of the Constituent	Percentages of Grain on	
	May 31	June 15
Moisture	9.15	9.02
Carbohydrates	70.35	70.37
Proteins	14.35	14.35
Crude Fiber	1.65	1.69
Fats	2.71	2.74
Ash	1.79	1.83
Total	100.00	100.00

Hardly any difference was noted in the grains collected at these two different dates, although ash, fats, carbohydrates and crude fibers increased somewhat at the later date while the moisture content decreased.

SUMMARY.

Hard winter wheat was grown from September to June. The composition of the plant as well as of the grain was determined. The data indicate that water was least during the early and late growth stages. Oils were highest at maturity. Nitrogen was small at first but increased later. Sugar was at minimum at first, increased and finally decreased. Starch was used by the plant in grain development. The grain had a very little difference at the two dates, although the moisture decreased at the later date while the chemical constituents increased somewhat.

The writer thanks his Technical Assistant, Mr. Ray Glynn, formerly of the Biology Department, St. Marys College, Kansas, U.S.A., for some assistance rendered in this experiment. Acknowledgement is due also to Mr. Mike Fritz, formerly also of the same college, for bringing and treating the samples in a fine manner.

REFERENCES.

- Brenchley, W. E. and Hall, A. D. (1908): The development of the grain of wheat. *Jour. Agr. Sci.*, **3**, 195.
- Dustman, R. B. and Shriver, L. C. (1931): The chemical composition of *Ambroisa trifida* at successive growth stages. *Jour. Amer. Soc. Agron.*, **23**, 190.
- Eckerson, S. H. (1917): Microchemical study in the progressive development of the wheat plant. *Wash. Arg. Exp. Sta. Bul.*, **139**.
- Hopper, T. H. and Nesbitt, L. L. (1930): The chemical composition of some North Dakota pasture hay grasses. *N. Dakota Ag. Exp. Sta. Bul.* **236**.
- Lawes, J. B. and Gilbert, J. H. (1884): On the composition of the ash of wheat grain and wheat straw. London.
- Lyon, T. L. (1905): Improving the quality of wheat. U.S.D.A., Bur. Plant Ind. Bul., **78**.
- Malhotra, R. C. (1930): Microchemical study of hemicelluloses in some plant cells with particular reference to its distribution in the protoplasm. *Jour. Biochem.*, **12**, 341.

- (1931): A modification of Pervier and Gortner's method for the estimation of pentosans in plant tissues. *Jour. Ind. Chem. Soc.*, **8**, 51.
- (1931): Notes on the determination of hemicelluloses. *Jour. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **3**, 161.
- Mathews, A. P. (1930): *Physiological chemistry*. Wood, New York.
- Newton, R. and Brown, W. R. (1926): Seasonal changes in the composition of winter wheat plants, in relation to frost resistance. *Jour. Agr. Sci.*, **16**, 522.
- Redzie, R. C. (1894): Composition of wheat at different periods of ripening of the straw at the same period. *Mich. Agr. Exp. Sta., Bul.*, **101**.
- Thatcher, R. W. (1913/15): The progressive development of the wheat kernel. Part I and II. *Jour. Amer. Soc. Agron.*, **5**, 203, also **7**, 273.
- Woodman, H. E. and Engledow, F. L. (1924): The chemical study of the development of the wheat grain. *Jour. Agr. Sci.*, **14**, 563.
- Yocum, L. E. (1925): The translocation of the food materials of the wheat seedlings. *Jour. Agr. Res.*, **31**, 727.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLE- HYDRATSTOFFWECHSEL. XXIX.

Über den Einfluss der Gallensäure auf die Gewebsoxydation und auf die Kohlehydratverbrennung.

VON

ZIRO URAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. Juni 1933)

Was den Einfluss der Gallensäure auf den Gaswechsel der Tiere anbetrifft, so hat Hatakeyama (1930) bewiesen, dass die Zufuhr von Gallensäure nicht nur den respiratorischen Quotienten bei nüchternen Kaninchen, sondern auch bei solchen mit experimentell erzeugter Hyperglykämie herabsetzt. Dabei hat er auch als seine Ansicht ausgesprochen, dass die Gallensäure einerseits den Prozess der Polymerisierung des Traubenzuckers im Organismus beschleunige, andererseits unter Sympathicuslähmung die Zuckerverbrennung hemme, indem die Adrenalinsekretion aus der Nebenniere durch die Sympathicuslähmung vermindert wird.

Es schien mir jedoch sehr wahrscheinlich zu sein, dass diese Herabsetzung des respiratorischen Quotienten nicht nur durch indirekte Wirkung der Gallensäure auf die Zuckerverbrennung mittelst des Nervensystems, sondern auch durch direkte Wirkung der Gallensäure bedingt wird.

Es war also von Interesse zu wissen, ob eine solche die Zucker-oxydation hemmende Wirkung auch für das aus dem Körper isolierte Gewebe unter Ausschaltung des Einflusses des Nervensystems und für den aus dem Gewebe erhaltenen Fermentextrakt gilt.

Eine für diesen Zweck sehr geeignete Methode ist die von Thunberg (1928), welche mit Hilfe der Methylenblaufärbung die Oxydationsgeschwindigkeit des Gewebes quantitativ zu messen

gestattet. Thunberg hat bei der Methylenblaureduktion des Gewebes die Wielandische Oxydationstheorie angewandt, laut welcher gewisse Oxydationen zunächst als Dehydrierungen aufzufassen sind. Dieses Prinzip und diese Methode nach Thunberg wurden von Warburg (1923) und anderen Autoren diskutiert. Unabhängig von jeder biologischen Oxydationstheorie können aber die mit der Methylenblaumethode festgestellten Unterschiede in den Reduktionszeiten auch auf folgende Weise einwandfrei ausgelegt werden: eine kürzere Entfärbungszeit bedeutet eine grössere Geschwindigkeit der Farbstoffreduktion. Da jeder Reduktion eine parallel verlaufende Oxydation entsprechen muss, so ist die Entfärbungszeit ein Massstab für die Oxydationsgeschwindigkeit im gegebenen System.

In dem oben erwähnten Sinne habe ich mittelst dieser Methylenblaumethode von Thunberg die direkte Wirkung der Gallensäure auf die Gewebsoxydation sowie auf die Kohlehydratverbrennung untersucht.

METHODIK.

Alle Untersuchungen wurden mit der Methylenblaumethode von Thunberg (1928) angestellt. Dabei wurden als Wasserstoffaktivator der Muskelbrei des Frosches und auch der Fermentextrakt aus Kaninchenmuskulatur und Kaninchenleber verwendet.

Der Muskelbrei des Frosches wurde in der von Ahlgren (1925) beschriebenen Weise bereitet, und der wirksame Fermentextrakt aus Kaninchenmuskel und -leber nach Thunberg (1928) hergestellt.

Die Donatoren, d. h. Milchsäure, Bernsteinsäure, Glycerinphosphorsäure usw. und die Gallensäure wurden immer als Kaliumsalz verwendet, da Natriumsalze beim Dehydrierungsversuche im allgemeinen vermieden werden sollen.

Der Froschmuskelbrei und der Gewebsextrakt des Kaninchens wurden jeweils unmittelbar vor dem Evakuieren des Vakuumröhrchens zugesetzt.

Das Evakuieren des Röhrchens dauerte stets 1,5 Minuten; nach

dem Verschluss wurde das Röhrchen sofort in den Wasserthermostaten gelegt.

Gemessen wurde die Zeit von der Senkung in das Wasserbad bis zum Eintritt vollständiger Entfärbung. Die Temperatur im Thermostaten wurde immer auf 37°C konstant gehalten.

I. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE GEWEBESOXIDATION.

Versuch 1.

Muskelbrei von Rana esculenta.

Die Muskeln der beiden Oberschenkel vom Winterfrosch (Februar) wurden fein zerschnitten. Jedes Rohr enthielt 0,9 ccm einer Mischung von 7 ccm Mb (1:500), 6 ccm einer $m/10$ K_2HPO_4 -lösung u. 7 ccm H_2O (630 γ Mb.), 0,2 g Muskelbrei und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration. (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, u. 1,0%).

Versuch 2.

Muskelextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm H_2O (20 γ Mb.), 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration und 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt enthalten.

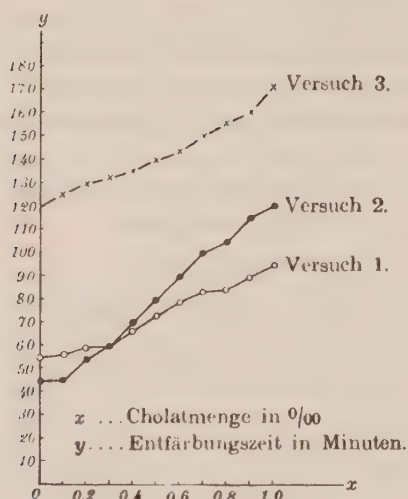
Versuch 3.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm H_2O (200 γ Mb.), 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt, 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 -lösung und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Der Versuch 1 zeigt die Einwirkung des Cholates in verschiedener Konzentration auf die Oxydationsintensität der Froschmuskulatur, und die Versuche 2 u. 3 zeigen seine Einwirkung auf die Oxydationsintensität des Extraktes aus Kaninchenmuskel und -leber.

Fig. 1.



Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, hat ein Zusatz von Cholal einen hemmenden Einfluss auf die Gewebsoxydation, genau wie es bei Insulin der Fall war, während es bei Adrenalin gerade umgekehrt ist, was Ahlgren (1925) in seinem Versuch beobachtet hat. Diese hemmende Wirkung der Cholsäure auf die Gewebsoxydation geht mit der Menge des zugesetzten Cholates parallel, und die Methylenblauentfärbung tritt in der Leber viel stärker hervor als im Muskel.

Um die Ursache der hemmenden Wirkung von Cholsäure auf die Gewebsatmung näher zu erforschen, wurde der Einfluss der Cholsäure in verschiedener Konzentration auf einen gewissen isolierten Oxydationsprozess bzw. auf die Kohlehydratverbrennung in den Geweben untersucht, einerseits weil der Kohlehydratveratmung eine biologisch so grosse allgemeine Bedeutung zukommt, dass ihre genaue Untersuchung sehr wünschenswert ist, andererseits weil die Gallensäure eine bedeutende Rolle im Kohlehydratstoffwechsel spielt, wie es von Shimizu und seinen Mitarbeitern bewiesen wurde.

II. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE TRAUBENZUCKERVERBRENNUNG.

Versuch 4.

Muskelextrakt des Kaninchens.

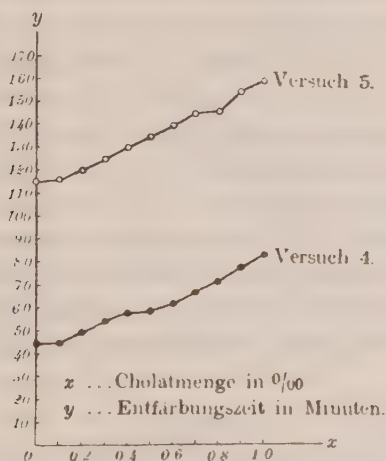
In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb(1:5000) u. 10 ccm einer 1%igen Traubenzuckerlösung (20 γ Mb.), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Versuch 5.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb(1:500) u. 10 ccm einer 1%igen Traubenzuckerlösung (200 γ Mb.), 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt, 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 lösung und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Fig. 2.



Wie aus den Versuchen 4 u. 5 hervorgeht, besitzt die Cholsäure das Vermögen, die Methylenblaureduktion durch den Gewebsextrakt zu hemmen, wenn man in die Röhre Glukose und Cholat zusetzt, hat jedoch bei Zusatz von Glukose allein keinen hemmenden

Einfluss auf diese Reduktion.

Wie ersichtlich geht die die Zuckerverbrennung hemmende Wirkung mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

Unter Anwendung dieser Methylenblaumethode zeigte schon Ahlgren (1925), dass das Insulin die Fähigkeit besitzt, die Atmungsintensität überlebender Muskulatur und gewisser anderer Gewebe erheblich zu steigern, wenn man in die Röhre Glukose und Insulin zusetzt, während bei Zusatz von Glukose allein kein Accelerationseffekt hervorgerufen wird. Der stimulierende Einfluss des Insulins auf die Methylenblaureduktion im Atmungssystem scheint also mit der Anwesenheit von Glukose verknüpft zu sein. Nach Ahlgren steigert der Insulinzusatz die Glukoseoxydation der Froschmuskulatur, wenn auch diese Steigerung nur in den ersten 2 Stunden nach dem Töten des Tieres stattfindet, während danach die Hemmung der Oxydation einsetzt. Auf Grund dieses Ergebnisses hat er behauptet, dass Insulin und Glukose zusammen mit einem in den Geweben vorhandenen, unbekannten, labilen Agens ein Dreikörpersystem bilden, dessen Intaktheit für die Entstehung der Accelerationswirkung des Insulins notwendig ist. Die Steigerung der Gewebsoxydation durch Adrenalin geht aber unabhängig von der Anwesenheit der Glukose vor sich, und im Gegensatz zum Insulinversuche bleibt beim Adrenalinversuche, auch noch nach zweistündigem Stehen des isolierten Gewebes in Zimmertemperatur, die Beeinflussbarkeit der Gewebsatmung durch Zusatz von Adrenalin bestehen.

In oben erwähntem Sinne wurde der folgende Versuch ausgeführt um festzustellen, ob die Beeinflussbarkeit der Gewebsoxydation durch Gallensäure bei Gegenwart von Glukose nur während eines beschränkten Zeitraumes nach dem Töten des Tieres bestehen bleibt.

Versuch 6.

Muskelbrei von Rana temporaria.

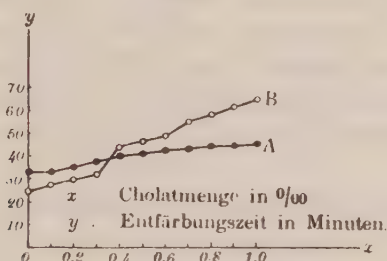
Sofort nach dem Töten des Winterfrosches wurde die Muskulatur des einen Schenkels fein zerschnitten. (A).

Die des anderen Beins wurde 2 Stunden lang in einer feuchten

Kammer bei 20°C aufbewahrt, dann fein zerschnitten. (B).

In jedem Rohr waren 0,9 ccm einer Mischung von 4 ccm Mb(1:500), 6 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 -Lösung, 2 ccm einer 0,5%igen Glukoselösung u. 8 ccm H_2O (360 γ Mb.), 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration und 0,2 g vom respektiven Muskelbrei enthalten.

Fig. 3.



Aus dem Versuch 6 geht hervor, dass das Cholat sowohl bei Anwesenheit von Glukose als auch ohne Glukose die Gewebsoxydation erheblich hemmt, und dass nach zweistündigem Stehen des Gewebes in Zimmertemperatur die Beeinflussbarkeit der Gewebsatmung durch Cholat bestehen bleibt.

Die Beeinflussbarkeit der Oxydation des B-Muskels, der 2 Stunden nach dem Tode in Zimmertemperatur gestanden hat, durch Cholat ist stärker als die der Oxydation des A-Muskels, der sofort nach dem Töten des Tieres zum Versuche gebraucht wurde.

Dieser Unterschied scheint nach meiner Ansicht darauf zu beruhen, dass während der ersten 2 Stunden nach dem Töten des Tieres eine Anhäufung von Milchsäure im Froschmuskel stattfindet, deren Oxydation durch Cholat stark gehemmt wird, wie es im Versuch 15 nachgewiesen wird.

Der Mechanismus des Hexoseabbaues wurde von vielen Autoren, wie Naunyn (1906), Bissinger (1923), Gottschalk (1924), schon mehrmals diskutiert und angenommen, dass der Abbau des Zuckers über Milchsäure nicht der einzige Weg der Zuckerzersetzung im Organismus sei. Nach Ahlgren soll der Glukoseabbau in Gegenwart von Insulin nicht über Milchsäure

führen.

Es ist also die Frage offen, ob der Hexoseabbau bei Anwesenheit von Gallensäure über Milchsäure oder über andere Bahnen führt.

Was den Einfluss der Gallensäure auf den Glukoseabbau in Milchsäure bzw. auf die Glykolyse anbetrifft, so hat schon Teraoka (1932) angegeben, dass die Gallensäure auf das glykolytische Ferment direkt hemmend einwirkt. Wenn der Glukoseabbau bei Anwesenheit von Gallensäure nicht über Milchsäure, sondern über andere Wege führt, so könnte wohl gesagt werden, dass die Gallensäure sowohl die Glykolyse als auch den Glukoseabbau über andere Bahnen erheblich hemmend beeinflusst.

III. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE FRUKTOSEVERBRENNUNG.

Versuch 7.

Muskelextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer 1%igen Fruktoselösung (20 γ Mb.), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Versuch 8.

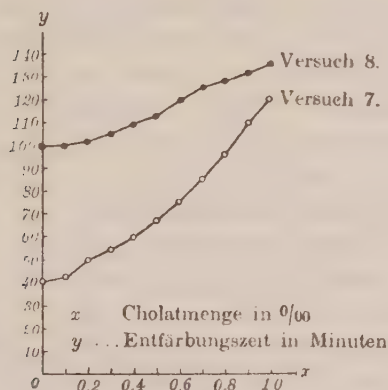
Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm einer 1%igen Fruktoselösung (200 γ Mb.), 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration, 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt und 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 -Lösung enthalten.

Aus diesen Versuchen 7 u. 8 geht hervor, dass die Cholsäure einen hemmenden Einfluss auf die Fruktoseoxydation ausübt, und dass dieser mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel geht.

Schon von Ahlgren (1925) wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu Glukose die Fruktose bei Anwesenheit von Insulin zu einer Hemmung der Oxydationsintensität in den Geweben führt.

Fig. 4.



Loebel hat behauptet (1925), dass Fruktose jedenfalls zunächst einmal nicht über Milchsäure oxydiert wird.

Es scheint mir aus den oben erwähnten Daten wohl hervorzugehen, dass die Cholsäure den Fruktoseabbau auf dem Nicht-Milchsäureweg hemmt.

IV. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE GLYKOGENOXYDATION.

Versuch 9.

Muskelextrakt des Kaninchens.

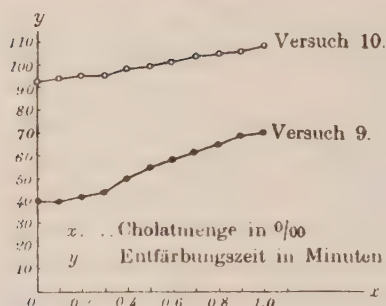
In jedem Rohr waren 0,3 cem einer Mischung von 5 cem Mb (1:5000) u. 10 cem einer 1%igen Glykogenlösung (20 γ Mb.), 0,6 cem von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 cem der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Versuch 10.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 cem einer Mischung von 5 cem Mb (1:500) u. 10 cem einer 1%igen Glykogenlösung (200 γ Mb.), 0,1 cem der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration, 0,3 cem einer $m/15$ K_2HPO_4 lösung und 0,3 cem von Kaninchenleberextrakt enthalten.

Fig. 5.



Über den Spaltungsprozess des Glykogens im Muskel und in der Leber herrscht noch keine völlige Klarheit; er verläuft indes höchstwahrscheinlich über die anoxybiotische Phase nach der Meyerhofschen Reaktion. Es wurde von Teraoka (1932) nachgewiesen, dass bei Zusatz von Gallensäure die Glykogenspaltung durch das Muskelferment stark gehemmt wird. Andererseits wurde von Ahlgren (1925) gezeigt, dass der Zusatz von Glykogen allein eine Beschleunigung der Gewebsoxydation hervorruft, während der Zusatz von Glykogen sowohl mit Insulin als auch mit Adrenalin keinen oder manchmal einen hemmenden Einfluss auf die Gewebsoxydation ausübt.

Aus den Versuchen 9 u. 10 erhellt, dass der Zusatz von Glykogen allein eine Beschleunigung, und der gleichzeitige Zusatz von Glykogen und Cholat eine Hemmung der Gewebsoxydation hervorruft. Diese hemmende Wirkung geht mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

V. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE HEXOSEDIPHOSPHORSÄURE- UND HEXOSEMONOPHOSPHORSÄUREOXYDATION.

Die Hexosediphosphorsäure hat die Fähigkeit, die Methylenblaufärbung des tierischen Gewebes sehr stark zu aktivieren, wobei höchstwahrscheinlich die Hexosediphosphorsäure selbst dehydriert wird, was bei Hefe-Hexosediphosphorsäure von Euler und seinem Mitarbeiter (1927) und von Hahn u. Haarmann (1930) bewiesen wurde. Weiter wurde von Broman (1930)

festgestellt, dass auch die Hexosemonophosphorsäure die Methylenblauentfärbung des enzymhaltigen Phosphatextraktes beschleunigt. Die Hexosemonophosphorsäure ist nach Broman bei der tierischen Dehydrase soviel weniger wirksam als Hexosediphosphorsäure, dass Thunberg die von Meyerhof (1927) vertretene Anschauung, dass Hexosediphosphorsäure eine Stabilisierungsform im intermediären Stoffwechsel sei, abgelehnt hat.

Nun ist schon von Deuticke (1930) festgestellt worden, dass Muskelhexosediphosphorsäure die Methylenblauereduktion ebenfalls beschleunigt, so dass er behauptet, dass die von Embden und seinen Mitarbeitern (1924, 1930) isolierte Hexosediphosphorsäure mit dem Harden-Young-Ester identisch sein dürfte. Weiter haben Hahn u. Haarmann (1930) experimentell beim Dehydrierungsversuche gezeigt, dass die Hexosediphosphorsäure nicht über Milchsäure zu Brenztraubensäure abgebaut wird.

Es ist also von Interesse, die Beziehung zwischen Gallensäure und Hexosephosphorsäuren bei der Geweboxydation zu untersuchen, weil einerseits die Hexosephosphorsäure als die wichtigste intermediäre Durchgangsstufe beim Abbau und Aufbau des Kohlehydrates im Organismus aufgefasst wird, und andererseits die Gallensäure einen erheblichen Einfluss auf die Synthese und Spaltung der Hexosephosphorsäuren in der Leber, der Niere und im Muskel ausübt, wie es von mir (1931) schon bewiesen wurde.

Versuch 11.

Muskelextrakt des Kaninchens.

A. Hexosediphosphorsaures Kalium.

Als Donator wurde $m/10$ hexosediphosphorsaures Kalium zum Versuch verwendet, das aus dem gereinigten Candiolin von Bayer nach der Methode von Neuberg u. Sabetay (1925) bereitet wurde, indem das Calciumsalz der Fruktosediphosphorsäure unter Zusatz von berechneten Mengen von Kaliumoxalat in Kaliumsalz umgewandelt wurde.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer $m/10$ hexosediphosphorsäuren

Kaliumlösung (20 γ Mb.), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

B. Hexosemonophosphorsaures Kalium.

Als Donator wurde $m/10$ hexosemonophosphorsaures Kalium zum Versuch verwendet, das aus dem Yatoconin von Shionogi (Fruktosemonophosphorsaures Calcium) bereitet wurde, indem das Calciumsalz unter Zusatz von berechneten Mengen Kaliumoxalat in Kaliumsalz umgewandelt wurde.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer $m/10$ hexosemonophosphorsauren Kaliumlösung (20 γ Mb.), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Versuch 12.

Leberextrakt des Kaninchens.

A. Hexosediphosphorsaures Kalium.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm einer $m/10$ hexosediphosphorsauren Kaliumlösung (200 γ Mb.), 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration, 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 lösung und 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt enthalten.

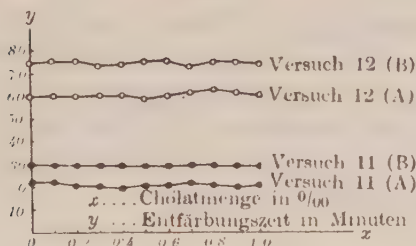
B. Hexosemonophosphorsaures Kalium.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm einer $m/10$ hexosemonophosphorsauren Kaliumlösung (200 γ Mb.), 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 lösung, 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Aus den Versuchen 11 (A. B.) und 12 (A. B.) geht hervor, dass bei Hexosedi- und Hexosemonophosphorsäure sowohl mit als auch ohne Cholat wider Erwarten fast kein merklicher Unterschied in den Reduktionszeiten nachgewiesen wird.

Von allen von mir untersuchten Stoffen ist die Fruktosephos-

Fig. 6.



phorsäure der einzige, dessen Oxydation durch Cholsäure nicht beeinflusst wird. Es scheint mir indes nicht richtig zu sein, aus diesen Ergebnissen ohne weiteres den Schluss zu ziehen, dass die Cholsäure gar keinen Einfluss auf die Hexosephosphorsäuredehydrogenase selbst ausübt, weil man an die Möglichkeit denken kann, dass es zwei verschiedene Wege für den Abbau der Hexosephosphorsäure in diesem Versuchssystem gibt, von denen der eine die Hexosephosphorsäurespaltung durch Phosphatase und der andere der Hexosephosphorsäureabbau durch Dehydrogenase ist. Die in das gegebene Reaktionssystem zugesetzte Hexosephosphorsäure wird also teils durch Phosphatase in Fruktose und Phosphorsäure gespalten, teils durch Dehydrogenase direkt in Brenztraubensäure abgebaut. Wenn die Phosphatasewirkung im gegebenen System die Dehydrogenasewirkung übertrifft, so wird die Methylenblaureduktion des Gewebes schwach ausfallen, weil unter allen Kohlehydraten die Hexosephosphorsäure am stärksten dehydriert wird, während die aus Hexosephosphorsäure durch Phosphatase erhaltene freie Fruktose nur schwach dehydriert, wie es von Hahn u. Haarmann (1930) nachgewiesen wurde.

Man kann also weiter sagen, dass die Methylenblaureduktion des Gewebes in diesen Versuchen um so stärker auftritt, je schwächer die Phosphatasewirkung ist.

Was den Einfluss der Gallensäure auf die Phosphatasewirkung betrifft, so habe ich (1931) schon bewiesen, dass die Cholsäure auf die Spaltung der Fruktosedi- und Fruktosemonophosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel hemmend wirkt, und dass diese hemmende Wirkung mit der Menge der zugesetzten Chol-

säure parallel geht.

Kein Unterschied in der Hexosed- und Hexosemonophosphorsäureoxydation sowohl mit als auch ohne Cholat weist darauf hin, dass die Cholsäure teils die Dehydrogenase, teils die Phosphatase in Geweben hemmend beeinflusst, da ja die echte Entfärbungszeit des Methylenblaus bei Dehydrierung der Hexosephosphorsäure allein nicht bestimmt werden konnte.

VI. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE GLYZERIN- PHOSPHORSÄUREOXYDATION.

Die Glyzerinphosphorsäure ist natürlich ein Spaltungsprodukt der Phosphatide, ist nach Meyerhof (1925) und Ahlgren (1925) ein starker Donator und wird nach Hahn u. Haarmann (1930) durch tierische Gewebe direkt zu Brenztraubensäure dehydriert.

Neulich hat Takata (1931) gezeigt, dass Cholsäure die Phosphorsäurespaltung aus Glyzerinphosphorsäure sowohl durch Leber als auch durch Nierenphosphatase hemmend beeinflusst.

Versuch 13.

Muskelextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer $m/10$ glyzerinphosphorsauren Kaliumlösung (20 γ Mb), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 1,0 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

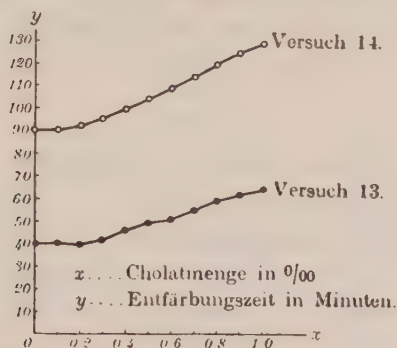
Versuch 14.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer $m/10$ glyzerinphosphorsauren Kaliumlösung (200 γ Mb.), 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 -Lösung, 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Wie aus den Versuchen 13 u. 14 ersichtlich ist, hemmt die Cholsäure auch den Dehydrierungsprozess der Glyzerinphosphor-

Fig. 7.



säure, wie es bei Insulin der Fall war, was auch von Ahlgren (1925) nachgewiesen wurde.

VII. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE MILCHSÄUREOXYDATION.

d-Laktat wurde aus Kaninchenmuskelextrakt hergestellt. Da Milchsäuredehydrase gegen Auswaschen mit Wasser sehr empfindlich ist, so wurden Muskel und Leber direkt mit sekundärem Kaliumphosphat, ohne Auswaschen mit Wasser, extrahiert. Die *d*-Milchsäure wird nach Hahn und Haarmann (1930) durch tierische Gewebe zu Brenztraubensäure dehydriert.

Versuch 15.

Muskelextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer *m*/10 *d*-Laktatlösung (20 γ Mb.), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

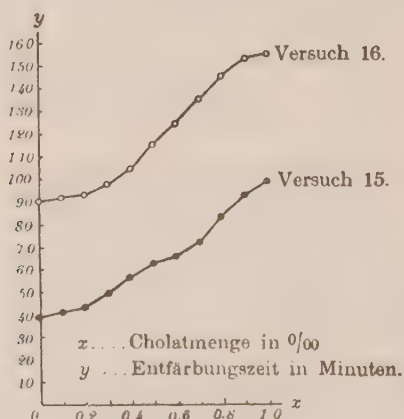
Versuch 16.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm einer *m*/10 *d*-Laktatlösung (200 γ Mb.), 0,3 ccm einer *m*/15 K_2HPO_4 lösung, 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt

und 0,1 cem der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Fig. 8.



Diese Ergebnisse der Versuche 15 u. 16 bedeuten, dass die Cholsäure auf die Milchsäuredehydrierung einen schädlichen Einfluss ausübt, wie es von Ahlgren (1925) bei Insulin nachgewiesen wurde.

VIII. ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE BERNSTEINSÄUREOXIDATION.

Die Succinodehydrase findet sich wohl in fast allen Geweben. Dass dieser Bernsteinsäureoxydation eine sehr erhebliche Bedeutung im Stoffwechsel zukommt, zeigte zuerst der Befund Einbecks (1914, 1919), dass Fumarsäure ebenso wie Bernsteinsäure im frischen Muskel vorkommt. Nach Einbeck entsteht aus Bernsteinsäure zunächst durch einfache Dehydrierung die Fumarsäure, die dann erst durch Wasseraufnahme in Äpfelsäure übergeht. Die Dehydrierung der Bernsteinsäure und die Weiterverarbeitung der Fumarsäure bilden also wohl zweifellos einen integrierenden Teil der Gewebsatmung, wenngleich beim Muskel nur einen kleinen Teil, da dieser in der Norm, zahlenmässig gemessen, fast nur Kohlehydrat oxydiert.

Da die Succinodehydrase an den allgemeinsten Grundvorgängen des Stoffwechsels beteiligt ist, so ist es von Interesse und von Bedeutung, den Einfluss der Cholsäure darauf hin zu untersuchen.

Versuch 17.

Muskelextrakt des Kaninchens.

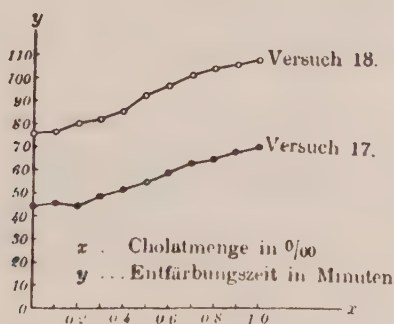
In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:5000) u. 10 ccm einer $m/10$ Kaliumsuccinatlösung (20 γ Mb), 0,6 ccm von Kaninchenmuskelextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Versuch 18.

Leberextrakt des Kaninchens.

In jedem Rohr waren 0,3 ccm einer Mischung von 5 ccm Mb (1:500) u. 10 ccm einer $m/10$ Kaliumsuccinatlösung (200 γ Mb.), 0,3 ccm einer $m/15$ K_2HPO_4 lösung, 0,3 ccm von Kaninchenleberextrakt und 0,1 ccm der Kaliumcholatlösung in variierender Konzentration enthalten.

Fig. 9.



Wie aus den Versuchen 17 u. 18 erhellt, hat die Cholsäure eine schädliche Einwirkung auf die Succinodehydrase, wie es auch von Ahlgren (1925) nachgewiesen wurde.

ZUSAMMENFASSUNG.

Mit Hilfe der Thunberg'schen Methylenblaumethode wurde

unter Verwendung von Dehydrogenaselösungen aus dem Muskel und der Leber von Kaninchen sowie aus dem Froschmuskel folgendes festgestellt:

1. Die Dehydrierungsvorgänge des Muskels von Kaninchen und Frosch sowie der Kaninchenleber werden durch Zusatz von Cholsäure gehemmt. Diese hemmende Wirkung geht mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

2. Die Cholsäure besitzt das Vermögen, die Methylenblauereduktion durch den Gewebsextrakt des Kaninchens zu hemmen, wenn in das Rohr Traubenzucker und Cholsäure zusammen zugesetzt werden; diese Hemmung ist um so stärker, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist.

3. Die Cholsäure hemmt die Gewebsoxydation des Froschmuskels erheblich bei Anwesenheit von Glukose, und die Beeinflussbarkeit der Gewebstatmung durch Cholsäure ist noch nach zweistündigem Stehen des isolierten Gewebes in Zimmertemperatur erhalten.

4. Die Cholsäure übt einen hemmenden Einfluss auf die Fruktose-, Glykogen-, Glycerinphosphorsäure-, Milchsäure- und Bernsteinsäureoxydation in der Leber und im Muskel des Kaninchens aus. Diese hemmende Wirkung geht ausnahmslos in allen Oxydationsprozessen mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

5. Es gibt in der Hexosediphosphorsäure- oder Hexosemonophosphorsäureoxydation sowohl mit als auch ohne Cholsäure keinen merklichen Unterschied in den Reduktionszeiten.

Dies scheint meiner Ansicht nach darauf zu beruhen, dass die Cholsäure teils auf die Dehydrogenase, teils auf die Phosphatase in den Geweben hemmend wirkt.

Aus diesen Ergebnissen kann man wohl den Schluss ziehen, dass die Cholsäure die Atmungsintensität bzw. die Kohlehydratverbrennung herabsetzt, sowohl im aus dem Körper isolierten Gewebe als auch im aus dem Gewebe erhaltenen Phosphatextrakte. Auf Grund dieser Daten wird also wohl klar, dass die Herabsetzung des respiratorischen Quotienten des Kaninchens bei Zufuhr von Gallensäure, die von Hatakeyama beobachtet wurde, nicht nur

auf der indirekten Wirkung der Gallensäure auf die Zuckerverbrennung vermittelt des Nervensystems, sondern auch auf der direkten Wirkung der Gallensäure beruht.

LITERATUR.

- Ahlgren, G. (1925): Skand. Arch. Phys. Suppl. z. Bd., 47
 Bissinger, E., Leser, E. J. u. Zipf, K. (1923): Klinische W., 2, 2233.
 Broman, T. (1930): Skand. Arch. Phys., 59, 25.
 Deuticke, H. J. (1930): Z. f. physiol. Chem., 192, 193.
 Einbeck, H. (1914): Z. f. physiol. Chem., 90, 301.
 Einbeck, H. (1919): Biochem. Z., 95, 296.
 Embden, G., Jost, H. u. Lehnartz, M. (1930): Z. f. physiol. Chem., 189, 261.
 Embden, G. u. Zimmermann, M. (1924): Z. f. physiol. Chem., 141, 225.
 Euler, H. u. Nilsson, R. (1927): Z. f. physiol. Chem., 162, 83.
 Gottschalk, A. (1924): Klinische W., 3, 713.
 Hahn, A. u. Haarmann, W. (1930): Z. Biol., 90, 231.
 Hatakeyama, T. (1930): Jl. of Biochem., 11, 273.
 Loebel, R. O. (1925): Biochem. Z., 161, 219.
 Meyerhof, O. (1925): Handbuch d. norm. u. path. Physiol., 8. (1) 476, Berlin.
 Meyerhof, O. u. Lohmann, K. (1927): Biochem. Z., 185, 113.
 Naunyn, B. (1906): Der Diabetes mellitus, Wien.
 Neuberg, C. u. Gottschalk, A. (1924): Biochem. Z., 146, 164.
 Neuberg, C. u. Sabetay, S. (1925): Biochem. Z., 161, 240.
 Takata, H. (1931): Jl. of Biochem., 14, 61.
 Teraoka, M. (1932): Biochem. Z., 249, 118.
 Thunberg, T. (1918): Skand. Arch. Phys., 35, 163.
 Thunberg, T. (1928): Oppenheimer-Pincussen. Die Fermente u. ihre Wirkungen, Bd. III. s. 1118.
 Uraki, Z. (1931): Jl. of Biochem., 14, 123.
 Warburg, O. (1923): Biochem. Z., 142, 518.

BEITRÄGE ZUR CHOLESTERINBESTIMMUNG IM BLUT.

I. Kritische Bemerkungen über einige Extraktionsmethoden und eine vereinfachte gravimetrische Bestimmungsmethode.

VON

KENZO KUSUI.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,
Nagasaki.)

(Eingegangen am 21. Juni 1933)

Bisher stützte sich die Mehrzahl der in der medizinischen Literatur niedergelegten Angaben über den Cholesterinhaushalt auf Ergebnisse, die mit Hilfe kolorimetrischer Bestimmungen gewonnen wurden. Wenn man aber in die Tiefe des Cholesterinstoffwechsels einen Einblick gewinnen will, so muss man immer die Beziehung des freien zum veresterten Cholesterin in Betracht ziehen. Daher wurde schon seit Jahren versucht, auch in die Klinik die Windaussche Digitoninmethode einzuführen. Eine gravimetrische Cholesterinbestimmung kann sich aber erst dann als klinische Untersuchungsmethode einbürgern, wenn die Bestimmung in einer kleinen Menge Blut oder Blutserum vorgenommen werden kann, und die Ausarbeitung nicht zu zeitraubend ist. Während die Bestrebungen mancher Forscher, wie Szent-Györgyi (1923), Tominaga (1925) und Mancke (1931), eine gravimetrische Mikrobestimmungsmethode aufzufinden, nicht zum Ziele führten, brachten Mühlbock und Kaufmann (1930–1931) in neuester Zeit eine solche Methode in Vorschlag, die eine exakte Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins mit weniger Material und in weniger Zeit als die bisher bekannten Methoden ermöglicht.

Seit dem letzten Jahre beschäftigen wir uns mit der Bestimmung des Cholesterins im Blute bei verschiedenen menschlichen und experimentellen Fällen von Ikterus unter Leitung von Prof.

Dr. S. Tsunoo. Als ich an meine Untersuchungen heranging, dachte ich zunächst daran, für meine Bestimmungen das Verfahren von Mühlbock und Kaufmann zu benutzen. Doch für die Anwendung der Digitoninmethode zur Cholesterinbestimmung im Blut oder im Blutserum ist eine vollständige Extraktion des Cholesterins und seiner Ester aus dem Blut oder aus dem Blutserum eine unentbehrliche Voraussetzung. Also unternahm ich zuerst, das Extraktionsverfahren von Mühlbock und Kaufmann und noch einige andere Extraktionsmethoden des Cholesterins und seiner Ester kritisch nachzuprüfen. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die von Mühlbock und Kaufmann beschriebene gravimetrische Methode bei der Anwendung am Blut oder Blutserum zuverlässige Werte gibt, dass jedoch die Ausarbeitungszeit für klinische Untersuchungszwecke noch zu lang ist. Daher unternahm ich es, das gravimetrische Verfahren weiter zu vereinfachen.

I. KRITISCHE NACHPRÜFUNG EINIGER EXTRAKTIONSMETHODEN.

1. *Das Verfahren von Fex.* Gegenwärtig wird im allgemeinen angenommen, dass das Fexsche Verfahren zur Extraktion des Cholesterins und seiner Ester aus den verschiedenen Geweben bzw. Organen das zuverlässigste ist. Aber Onizawa (1928) und Mühlbock und Kaufmann haben aus ihren Untersuchungsergebnissen geschlossen, dass das Verfahren von Fex bei der Extraktion des Cholesterins aus Blut und Blutserum versagt. Auch ich selbst stellte Untersuchungen darüber an, ob das genannte Verfahren zum letzteren Zwecke geeignet sei.

10,0 ccm Oxalatblut oder Blutserum wurden mit 20 ccm 2%iger Natronlauge versetzt, 3 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen und dann etwa 1 Stunde auf siedendem Wasserbade gekocht, worauf nach der Vorschrift von Fex Cholesterin und Cholesterinester aus der alkalischen Lösung im Scheidetrichter zweimal mit je 150 ccm Äther extrahiert wurden. Nach dem Verdunsten des Äthers wurde der getrocknete Rückstand zur Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins auf gewöhnliche Weise nach der Digitoninmethode weiter bearbeitet. Mit Rücksicht

auf die Anschauungen von Thaysen (1914), Fex (1920) und Dam (1928) habe ich bei der Ausfällung des Digitonincholesterids immer über 30% Digitoninüberschuss verwendet und den Niederschlag 24 Stunden lang stehen lassen. Zur Verseifung der Cholesterinester bediente ich mich des von Windaus (1910) angegebenen, später von Thaysen etwas modifizierten Verfahrens.

Um die Vollständigkeit der Extraktion zu prüfen, wurde die Rückstandflüssigkeit der Ätherextraktion weiter achtmal mit je 50 ccm Äther extrahiert und an je zwei Portionen der Ätherextrakte die Cholesterinreaktion nach Liebermann-Burchard ausgeführt.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Ver- suchs- nummer	Versuchs- material	Das wievielte Mal d. Ätherextraktion	Freies Cholesterin %	Ester- Cholesterin %	Total- Cholesterin %
1	Menschen- blut.	1- 2	0,0639	0,0107	0,0746
		3- 4	Liebermann-Burchardsche R. (+)		
		5- 6	"	"	" (+)
		7- 8	"	"	" (+)
		9-10	"	"	" (+)
2	Hundeblut.	1- 2	0,0432	0,0270	0,0702
		3- 4	Liebermann-Burchardsche R. (+)		
		5- 6	"	"	" (+)
		7- 8	"	"	" (+)
		9-10	"	"	" (+)
3	Menschen- blutserum.	1- 2	0,0258	0,0596	0,0854
		3- 4	Liebermann-Burchardsche R. (+)		
		5- 6	"	"	" (+)
		7- 8	"	"	" (+)
		9-10	"	"	" (+)

Diese Versuchsergebnisse bestätigten die Angabe von Onizawa sowie von Mühlbock und Kaufmann, dass die Original-

methode von Fex zur Extraktion des Cholesterins und seiner Ester aus dem Blut oder Blutserum nicht geeignet ist.

2. *Das Verfahren von Onizawa.* Bei Extraktion des Cholesterins aus den verschiedenen Geweben bzw. Organen beseitigte Onizawa den Nachteil der Fexschen Originalmethode und gelangte zu seiner endgültigen Methode, indem er das in 2%iger Natronlauge gelöste Material unter Zusatz von Alkohol oder Aceton mit Äther extrahierte. Nun prüfte ich, ob dieses Verfahren zur Extraktion des Cholesterins aus dem Blut und dem Blutserum brauchbar sei.

10,0 ccm Oxalatblut oder Blutserum wurden mit 20 ccm 2%iger Natronlauge versetzt, 3 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen und dann 1 Stunde auf dem siedenden Wasserbade gekocht. Nach Abkühlen wurde die alkalische Lösung in einen Scheidetrichter gespült und mit 20 ccm Aceton versetzt. Nach guter Durchmischung wurde der Trichterinhalt dreimal mit je 100 ccm Äther ausgeschüttelt. Die gesammelten Ätherextrakte wurden zuerst mit ganz verdünnter Natronlauge und dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Verdunsten des Äthers wurde der getrocknete Rückstand zur Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins in oben (unter I. 1.) beschriebener Weise nach der Digitoninmethode bearbeitet. Dabei konnte ich feststellen, dass dreimalige Extraktion mit Äther zur vollständigen Entfernung des Cholesterins ausreichte, da die vierte Extraktion keinen Extrakt mehr ergab, der positive Liebermann-Burchardsche Reaktion zeigte.

Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, dass das Verfahren von Onizawa zuverlässige Werte für den Cholesterin- und Cholesterinestergehalt im Blut und im Blutserum ergibt.

3. *Das Verfahren von Mühlbock und Kaufmann.* Zur Extraktion des Cholesterins und seiner Ester aus dem Blut und Blutserum benutzten Mühlbock und Kaufmann die Alkohol-ätherextraktionsmethode von Bloor (1916–1922), die später von R. Mancke zur gravimetrischen Mikrobestimmung des Cholesterins und seiner Ester im Blutserum angewendet wurde. Auch das

TABELLE II.

Ver- suchs- nummer	Versuchs- material	Das wievielte Mal d. Ätherextraktion	Freies Cholesterin %	Ester- Cholesterin %	Total- Cholesterin %
1	Menschen- blut.	1-3	0,0878	0,0785	0,1663
		4	Liebermann-Burchardsche R. (—)		
2	Menschen- blut.	1-3	0,0763	0,0450	0,1213
		4	Liebermann-Burchardsche R. (—)		
3	Hundeblut.	1-3	0,0765	0,0686	0,1451
		4	Liebermann-Burchardsche R. (—)		
4	Menschen- blutserum	1-3	0,0647	0,1354	0,2001
		4	Liebermann-Burchardsche R. (—)		

Mühlbock-Kaufmannsche Verfahren unterzog ich einer genauen Nachprüfung.

10,0 ccm Oxalatblut oder Blutserum wurden in 250 ccm einer Mischung, die aus 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther bestand tropfenweise gegeben und einige Stunden lang stehen gelassen. Man filtriert dann unter sorgfältigem Nachwaschen mit Alkohol-Äther (3:1) den Eiweissniederschlag ab. Wenn dabei die Eiweissflocken noch Cholesterin oder Cholesterinester enthielten, so könnte ein Verlust der letzteren Substanzen entstehen; und das Mühlbock-Kaufmannsche Verfahren würde eine unbrauchbare Methode werden. Um die Eiweissflocken auf ihren Cholesteringehalt zu prüfen, wurde jeder einzelne von Alkoholätherextrakt befreite Niederschlag in je 10 ccm 2%ige Natronlauge gebracht, 3 Stunden lang stehen gelassen und dann auf dem Wasserbade 1 Stunde lang gekocht. Die tief dunkelbräunlich verfärbte Lösung wurde nun nach Onizawa unter Zusatz von Aceton mit Äther geschüttelt. Dieser Ätherextrakt wurde auf Cholesterin mit Digitoninprobe oder Liebermann-Burchardscher Probe geprüft. Aber ich konnte niemals Cholesterin nachweisen. Durch diese Versuche kam ich zur Überzeugung, dass man mit Alkoholätherextraktion nach Bloor Cholesterin und Cholesterinester aus

dem Blut oder Blutserum quantitativ extrahieren kann.

Der von Eiweissniederschlag abfiltrierte Alkohol-Ätherextrakt wurde zur Trockne verdampft; der getrocknete Rückstand wurde mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherextrakt wurde wieder zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgelaugt. In dieser alkoholischen Lösung wurde dann in oben (unter I. 1.) beschriebener Weise das freie Cholesterin und die Cholesterinester bestimmt. Bei den einzelnen Behandlungen prüfte ich den Extraktionsrückstand auf die Cholesterinreaktion. Aber ich konnte in keinem Falle mehr Cholesterin nachweisen.

Nachdem ich die obigen verschiedenen Methoden, Cholesterin und seine Ester aus dem Blut und Blutserum zu extrahieren, kritisch durchgeprüft hatte, verglich ich die Ergebnisse der Bestimmungen, die mit verschiedenen Methoden an demselben Material angestellt worden waren, miteinander.

In Tabelle III sind die Resultate zusammengestellt.

TABELLE III.

		Freies Cholesterin %		Estercholesterin %		Totalcholesterin %	
Extraktionsmethode		nach Mühlbock	nach Fex	nach Mühlbock	nach Fex	nach Mühlbock	nach Fex
Versuchs- material	Menschenblut	0,0737	0,0639	0,0712	0,0107	0,1449	0,0746
	Hundeblut	0,0649	0,0432	0,0659	0,0270	0,1308	0,0702
	Menschen Serum	0,0637	0,0258	0,1361	0,0596	0,1998	0,0854
Extraktionsmethode		nach Mühlbock	nach Onizawa	nach Mühlbock	nach Onizawa	nach Mühlbock	nach Onizawa
Versuchs- material	Menschenblut	0,0882	0,0878	0,0790	0,0785	0,1672	0,1663
	Menschenblut	0,0773	0,0763	0,0445	0,0450	0,1218	0,1213
	Hundeblut	0,0756	0,0765	0,0675	0,0686	0,1431	0,1451
	Menschen Serum	0,0637	0,0647	0,1361	0,1354	0,1998	0,2001

Wie man aus der Tabelle ersieht, ergibt die Fexsche Extraktionsmethode immer viel niedrigere Werte als das Mühlbock-Kaufmannsche Verfahren, während das letztere und die Onizawasche Methode in allen Fällen ganz übereinstimmende Werte ergeben.

II. EINE VEREINFACHTE GRAVIMETRISCHE BESTIMMUNGSMETHODE DES CHOLESTERINS IM BLUT UND BLUTSERUM.

Die von Mühlbock und Kaufmann vorgeschlagene gravimetrische Bestimmungsmethode des Cholesterins kommt mit einer geringeren Menge Blut als die bisher üblichen anderen Methoden aus. Aber zur vollständigen Durchführung dieser Methode hat man wenigstens 6 Tage nötig, so dass eine Verkürzung der Ausarbeitungszeit und dazu eine weitere Verminderung der Blutmenge für Serienuntersuchungen in der Klinik sehr erwünscht sind. Also schlage ich das folgende Verfahren vor, das in der Klinik leicht ausführbar und dabei weniger zeitraubend (3 Tage) ist. Das definitive Verfahren ist wie folgt:

5,0 ccm Oxalatblut oder Blutserum werden in 125 ccm einer Mischung von 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther tropfenweise hineingetan. Nachdem diese Mischung einige Stunden stehen gelassen worden ist, wird sie filtriert und mit Alkoholäthergemisch, das aus 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther besteht, gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zum Trocknen gebracht und der Rückstand mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherextrakt wird wieder zur Trockne verdampft und der Rückstand weiter 3mal mit 3 ccm Alkohol ausgelaugt. Die alkoholische Lösung wird in einem Messkölbchen auf 10,0 ccm aufgefüllt. Aus einer Hälfte dieser alkoholischen Lösung wird das freie Cholesterin, aus der anderen das Gesamtcholesterin nach Verseifung bestimmt. Die Differenz beider Werte ergibt das veresterte Cholesterin.

1. Bestimmung des freien Cholesterins.

5,0 ccm alkoholische Lösung (entsprechend 2,5 ccm Blut oder Serum) werden aus dem oben genannten Messkölbchen abpipettiert und in einen Becher von 30 ccm getan. Die Lösung wird auf der elektrischen Heizplatte vorsichtig erwärmt, dann mit 2 ccm heisser 1%iger alkoholischer Digitoninlösung versetzt und zur vollständigen Ausfällung des Digitonincholesterids über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wird in einen kleinen Goochtiiegel von bekanntem Leergewicht (etwa 5 g Gewicht) abgesaugt und 2

mal mit je 1 ccm Alkohol, dann 2mal mit je 1 ccm Äther nachgewaschen. Der Tiegel mit dem Niederschlag wird bei 90°–100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann gewogen. Die Berechnung des Cholesterins aus dem Niederschlage geschieht nach der Angabe von Windaus durch Multiplikation mit 0,25. Wenn man also die erhaltenen Werte für das Digitonincholesterid einfach mit 10 multipliziert, so erhält man die Werte für das freie Cholesterin in 100,0 ccm Blut oder Blutserum.

2. Bestimmung des Gesamtcholesterins.

5,0 ccm alkoholische Lösung (entsprechend 2,5 ccm Blut oder Serum), die im Messkölbchen übrig bleiben, werden in einen Erlenmeyerkolben von 50 ccm gebracht und zweimal mit je 5 ccm Alkohol nachgespült. Die alkoholische Lösung wird mit etwa 0,6 g metallischem Natrium versetzt und unter Gebrauch des Rückflusskühlers auf dem Sandbad 4 Stunden lang sieden gelassen. Die noch heisse alkoholische, jetzt verseifte Lösung wird in einen Scheidetrichter gegossen; der Verseifungskolben wird zweimal mit je 30 ccm Äther nachgewaschen, der auch in den Scheidetrichter getan wird. Der Inhalt im Scheidetrichter wird leicht geschüttelt, dann mit 10 ccm Wasser versetzt, wieder geschüttelt und weiter bis zur Klärung stehen gelassen. Die wässrige alkoholische Schicht wird in einen anderen Scheidetrichter abgezapft. Nachdem der im ersten Trichter zurückgebliebene Äther noch einigemal mit wenig Wasser gewaschen und dieses wieder in den zweiten Scheidetrichter gebracht worden ist, schüttelt man den Inhalt des letzteren nochmals mit 50 ccm Äther aus. Alle Ätherextrakte werden gesammelt, mit kleinen Mengen ganz verdünnter Natronlauge und dann mit kleinen Mengen Wasser wiederholt so lange ausgeschüttelt, bis das Wasser gegen Phenolphthalein keine Rotfärbung mehr zeigt, und schliesslich verdunstet. Der Rückstand wird in 5 ccm heissem Alkohol gelöst und mit 4 ccm heisser 1%iger alkoholischer Digitoninlösung versetzt. Das Absaugen, das Austrocknen und das Wägen des Niederschlages und die Berechnung werden in gleicher Weise wie bei der Bestimmung des freien Cholesterins vorgenommen.

Die Resultate, die nach meiner eignen Methode gewonnen wurden, und die nach Mühlbock-Kaufmannscher Methode erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV.

Versuchsmaterial	Freies Cholesterin %		Estercholesterin %		Totalcholesterin %	
	nach Mühlbock-scher Methode	nach eigener Methode	nach Mühlbock-scher Methode	nach eigener Methode	nach Mühlbock-scher Methode	nach eigener Methode
Menschenblut	0,0834	0,0863	0,0562	0,0537	0,1396	0,1400
Menschenserum	0,0634	0,0663	0,1167	0,1150	0,1801	0,1813
Hundeblut	0,0882	0,0900	0,0729	0,0687	0,1611	0,1587

Wie man aus der Tabelle ersieht, ergeben beide Methoden miteinander gut übereinstimmende Resultate.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Einige Extraktionsverfahren des Cholesterins aus dem Blut und Blutserum unterzog ich einer kritischen Nachprüfung. Dadurch wurde das Verfahren von Fex für Bestimmung des Cholesterins im Blut und Blutserum als ungeeignet, die Verfahren von Onizawa und von Mühlbock und Kaufmann aber als geeignet erwiesen.

2. Ich schlug weiter eine vereinfachte gravimetrische Bestimmungsmethode des Cholesterins im Blut und Blutserum vor. Durch diese Methode wird eine Ersparung an der Arbeitszeit und der Blutmenge erzielt, und dennoch werden zuverlässige Werte des Cholesterins und der Cholesterinester im Blut oder Blutserum gewonnen.

LITERATUR.

- Bloor, W. (1916): J. of biol. Chem., **24**, 227.
 Bloor, W. und Knudson, A. (1916): ebenda **27**, 107.
 Bloor, W., Pelkan, F. und Allen, M. (1922): ebenda, **52**, 191.
 Dam, H. (1928): Biochem. Z., **194**, 188.

- Fex, J. (1920): ebenda **104**, 82.
Mancke, R. (1931): ebenda **231**, 103.
Mühlbock, O. und Kaufmann, C. (1930–1931): Klinische W., **9**, 2019.
Biochem. Z., **233**, 222.
Onizawa, J. (1928): J. of Biochem., **10**, 45.
Szent-Györgyi (1923): Biochem. Z., **136**, 107.
Thaysen, H. (1914): ebenda, **62**, 89.
Tominaga, T. (1925): ebenda, **155**, 119.
Windaus, A. (1910): Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Chem., **65**, 110.

BEITRÄGE ZUR CHOLESTERINBESTIMMUNG IM BLUT.

II. Über die Kombination der kolorimetrischen mit der Digitoninmethode.

VON

KENZO KUSUI.

*(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,
Nagasaki.)*

(Eingegangen am 21. Juni 1933)

Die kolorimetrische Cholesterinbestimmung wird im allgemeinen als nicht so zuverlässig wie die Digitoninmethode betrachtet. Aber Dam (1928) schloss aus seinen Untersuchungsergebnissen, dass eine genauere Methode zur Bestimmung des Totalcholesterins, wenn die Esterfraktion klein ist, darin besteht, das freie Cholesterin erst mit Digitonin auszufällen und die Ester danach im Filtrat kolorimetrisch zu bestimmen. Nun versuchte ich auch zur Bestimmung des freien Cholesterins und seiner Ester im Blut und Blutserum die kolorimetrische mit der Digitoninmethode zu kombinieren.

Zuerst bestimmte ich das freie Cholesterin nach dem gravimetrischen Verfahren von Mühlbock und Kaufmann (1931). Also wurden 10,0 ccm Oxalatblut oder Blutserum in 250 ccm Alkohol-Äthergemisch (3:1) tropfenweise hineingegeben und einige Stunden lang stehen gelassen. Dann filtrierte man den Eiweissniederschlag unter sorgfältigem Nachwaschen mit Alkohol-Äthergemisch (3:1) ab. Der Alkohol-Ätherextrakt wurde zur Trockne verdampft und der getrocknete Rückstand mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherextrakt wurde wieder zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgelaugt. Diese alkoholische Lösung wurde zur Ausfällung des freien Cholesterins mit 1%iger alkoholischer Digitoninlösung versetzt und über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und zur gravimetrischen Bestimmung des freien Cholesterins gebraucht.

Das Filtrat des Digitonincholesterids wurde bis zur Trockne eingedampft und nach Fex's Angabe (1920) mit Äther extrahiert, indem es über Nacht mit 70 ccm Äther stehen gelassen, filtriert, einige Minuten bei 100°C getrocknet, aufs neue mit 70 ccm Äther ausgezogen, wiederum über Nacht stehen gelassen und schliesslich nochmals filtriert wurde. Die vereinigten Ätherextrakte wurden bis zur Trockne eingedampft, und der Rückstand wurde zweimal mit je 10,0 ccm Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden zusammengebracht und auf 25,0 ccm aufgefüllt. 5,0 ccm dieses Extraktes wurden in einen graduierten, mit Glasstopfen versehenen Zylinder von 10,0 ccm übergeführt, mit 2,0 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und gut durchgemischt. Nach 15 Minuten langem Stehen bei 35°C im Dunkeln wurde die Lösung in das Kolorimeter gefüllt und gegen die Standardcholesterinlösung, die 1,0 mg wasserfreien Cholesterins in 5,0 ccm Chloroform enthielt und weiter mit denselben Reagenzien versetzt wurde, verglichen. Während der ganzen Prozedur wurden die zu untersuchende Probe und die Standardlösung, was Belichtung und Erwärmen betrifft, vollkommen gleich behandelt. Um zu sehen, ob die von mir angegebene Kombinationsmethode zur Bestimmung des Cholesterins im Blut wirklich zuverlässige Werte ergibt, bestimmte ich freies und Estercholesterin im Blut ausser mit meiner eignen Kombinationsmethode auch mit der gravimetrischen von Mühlbock und Kaufmann an demselben Material und verglich beide Werte. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass die nach dem Kombinationverfahren gefundenen Werte mit den gravimetrisch ermittelten ziemlich gut übereinstimmen.

Weiter versuchte ich diese Kombinationsmethode zu vereinfachen. Das definitive Verfahren ist kurz zusammengefasst wie folgt:

1. *Extraktion:* 2,5 ccm Oxalatblut oder Blutserum werden in 60 ccm einer Mischung von 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther tropfenweise eingebracht, einige Stunden stehen gelassen und dann unter gründlichem Nachwaschen mit Alkoholäther(3:1) filtriert.

TABELLE I

Versuchs- nummer	Freies Cholesterin %	Estercholesterin %		Totalcholesterin %	
	nach Mühlbock	nach Mühlbock	nach Kolorimetrie	nach Mühlbock	nach Kombination
1	0,0686 0,0690	0,0433	0,0441	0,1119	0,1131
2	0,0856 0,0853	0,0566	0,0600	0,1422	0,1453
3	0,0823 0,0820	0,0537	0,0555	0,1360	0,1375
4	0,1004 0,1012	0,0429	0,0444	0,1433	0,1456
5	0,0783 0,0780	0,0644	0,0652	0,1427	0,1432

Das Filtrat wird zur Trockne gebracht und der Rückstand mit Äther erschöpfend extrahiert.

2. *Bestimmung des freien Cholesterins:* Der Ätherextrakt wird wieder zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit 5 ccm Alkohol ausgelaut. Der Alkoholextrakt wird mit 2 ccm heisser 1%iger alkoholischer Digoninlösung versetzt und zur vollständigen Ausfällung des Cholesterindigonids über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wird in einen kleinen Goochtiiegel von bekanntem Leergewicht (etwa 5 g) abgesaugt und 2 mal mit je 1 ccm Alkohol, dann 2 mal mit je 1 ccm Äther nachgewaschen. Der Tiegel mit Niederschlag wird bei 90–100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann gewogen. Die Berechnung des Cholesterins aus dem Niederschlage geschieht nach Angabe von Windaus durch Multiplikation mit 0,25. Wenn man die erhaltenen Werte für das Digonincholesterid mit 10 multipliziert, so erhält man die Werte für das freie Cholesterin in 100,0 ccm Blut oder Blutserum.

3. *Bestimmung des Estercholesterins:* Das Filtrat des Digonincholesterids wird zur Trockne eingedampft, und die Cholesterinester werden nach Fex's Angabe auf oben erwähnte Weise zweimal mit je 20 ccm Äther extrahiert. Nachdem der Extrakt bis

zu einem kleinen Volumen eingedampft worden ist, wird er quantitativ in einen Messkolben von 25,0 cem gebracht und mit Äther aufgefüllt. 5,0 cem Ätherextrakt werden in einem Becherrchen von 30 cem getrocknet. Der Rückstand wird in 3 cem Chloroform gelöst. Diese Chloroformlösung wird dann in einen 10 cem fassenden, graduierten, mit Glasstopfen versehenen Zylinder übergeführt, mit Chloroform auf 5,0 cem aufgefüllt, indem man mit dem hinzuzusetzenden Chloroform das Becherrchen nachwäscht, weiter mit 2,0 cem Essigsäureanhydrid und 0,1 cem konz. Schwefelsäure versetzt und durchmischt. Nachdem die Lösung 15 Minuten lang bei 35°C im Dunkeln stehen gelassen worden ist, wird sie in dem Autenriethschen Apparat (F. Hellige & Co. Freiburg i. B. Cholesterin 18719) kolorimetrisch bestimmt.

Um mein Kombinationsverfahren auf seine Zuverlässigkeit zu prüfen, verglich ich die Resultate, die mit diesem Verfahren gewonnen wurden, mit denen, die meine eigene gravimetrische Methode an demselben Material ergab (vergleiche I. Mitt.). Dabei wurden einerseits Gesamt- und freies Cholesterin nach meinem gravimetrischen Verfahren bestimmt, auch das Estercholesterin berechnet. Andererseits wurde das Filtrat des Digitonids vom freien Cholesterin zu meiner oben beschriebenen kolorimetrischen Bestimmung benutzt.

Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass das Cholesterin und seine Ester mit nur 2,5 cem Blut nach meinem Kombinationsverfahren zuverlässig bestimmt werden können.

ZUSAMMENFASSUNG.

Hier wurde eine neue Bestimmungsmethode des Cholesterins und seiner Ester im Blut oder Blutserum vorgeschlagen. Sie besteht aus der Kombination der Gravimetrie und der Kolorimetrie, von denen die erstere zur Bestimmung des freien Cholesterins und die letztere zur Ermittlung des Estercholesterins angewendet wird.

Mit dieser Methode sind 2,5 cem Blut oder Blutserum hinreichend, um das Cholesterin und seine Ester quantitativ zu erfassen.

TABELLE II.

Versuchsmaterial	Nach meinem gravimetrischen Verfahren			Nach meiner Kolorimetrie
	Gesamtchl. %	Freies Chl. %	Esterchl. %	Esterchl. %
Hundeblut (T.D.M.-Ikterus)	0,168	0,110	0,058	0,0586
„ „	0,154	0,107	0,047	0,0444
„ „	0,160	0,117	0,043	0,0464
„ „	0,193	0,143	0,050	0,0500
„ „	0,168	0,118	0,050	0,0468
Menschenblut (52. Lj.) (Invagination)	0,158	0,100	0,058	0,0564
Menschenblut (23. Lj.) (Icterus catarrhalis)	0,133	0,109	0,024	0,0316
Menschenblut (23. Lj.) (Rekonval. d. Ict. cat.)	0,166	0,093	0,073	0,0684

LITERATUR.

Dam, H. (1928): Biochem. Z., **194**, 188.

Fex, J. (1920): Biochem. Z., **104**, 82.

Mühlbock, O. und Kaufmann, C. (1931): Biochem. Z., **233**, 222.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER ALKOHOLXYDASE.

VON

HITOSHI MIZUSAWA.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. K. Kodama)
und der III. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. N. Onodera)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen
Kyushu-Universität zu Fukuoka)*

(Eingegangen am 23. Juni 1933)

INHALT

1. Einleitung.
2. Die Aktivität der Alkoholxydase in verschiedenen Organen.
3. Darstellung der Alkoholxydase.
4. Der Einfluss der Konzentration des Äthylalkohols.
5. Das Redox-Potential der Alkoholxydase.
6. Untersuchungen mit an Alkohol gewöhnten Tieren.
7. Über die Oxydation einiger aliphatischer einwertiger Alkohole.
8. Über die Oxydation der aliphatischen mehrwertigen Alkohole durch die Alkoholxydase.
9. Einfluss verschiedener Arzneimittel auf die Alkoholxydase.
 - a) Einfluss des KCN.
 - b) Einfluss von Pyrrol.
 - c) Einfluss des Rindernebennieren-Extrakts.
10. Einfluss der Ultravioletten- und Röntgen-Strahlen auf die Alkoholxydase.
11. Zusammenfassung und Literatur.

1. Einleitung.

Es ist eine bekannte Tatsache, dass der Alkohol im Tierorganismus leicht verbrennt, und dass die frei werdende Verbrennungswärme als Lebensenergie ebenso gut wie die anderer Nahrungsmittel verwertet werden kann. Aber die Oxydationsweise des Alkohols im Tierorganismus, besonders die Rolle der Alkoholxydase ist noch nicht befriedigend erklärt worden; sie wird zum Teil den labilen Eigenschaften der Fermente zugeschrieben.

Die Alkoholoxydase im Tiergewebe haben hauptsächlich Battelli und Stern (1910) untersucht. In ihrer ersten Mitteilung wurde die Meinung geäußert, dass dieses Ferment unter Sauerstoffverbrauch die Oxydation ausführen kann. Bei späteren Untersuchungen aber fanden sie, dass dieses Ferment bei Vorhandensein von Alkohol Thionin entfärbt d. h. dehydrogenetische Oxydation von Alkohol im Sinne von Wieland leisten kann. Es ist auch bewiesen, dass dabei Acetaldehyd entsteht. Verfasser hat noch einmal die verschiedenen Eigenschaften dieses Ferments eingehend mit besonderer Berücksichtigung der Isolierung des Ferments und dessen Verhaltens bei an Alkohol gewöhnten Tieren untersucht.

2. Die Aktivität der Alkoholoxydase in verschiedenen Organen.

Zuerst wurde von Battelli und Stern (1910) nachgewiesen, dass unter den tierischen Organen nur die Leber die Oxydation des Alkohols bewirken kann. Ganz dasselbe Resultat wurde auch vom Verfasser erhalten, wie die Ergebnisse der folgenden Versuche zeigen. Das frische Organgewebe wurde möglichst klein zerschnitten und mit Wasser 3–4 Stunden lang gründlich gewaschen; nach der Entwässerung wurde zwischen Filterpapier eine bestimmte Menge abgewogen und im Mörser mit Seesand zerrieben.

Der so behandelten Gewebsmasse wurde eine berechnete Menge Phosphatpuffer zugesetzt und schliesslich ein 10%iger Gewebsbrei erhalten. Nach einmaliger Filtration durch Gaze wurde dieser Brei in einer Menge von 1.0 ccm in eine Thunberg'sche Vacuumröhre abpipettiert. Dazu wurden je 1.0 ccm *M*/25 Äthylalkohol, *M*/5000 Methylenblaulösung und *M*/15 Phosphatpuffer zugesetzt. Dann wurde die Röhre mittels der Gæde'schen Pumpe bei 2 mm Hg Druck 1 Minute lang evakuiert, in den Thermostaten (40°C) eingetaucht und der Zeitverlauf vom Moment des Eintauchens bis zur vollständigen Entfärbung des Methylenblaus gemessen.

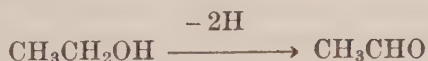
Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schliessen, dass die Entfärbungszeit deutlicher in der Leber und schwach in der Niere verkürzt wird. Es ist aber eine noch offene Frage, ob letzten

TABELLE I.
Die Alkoholdehydrogenase im tierischen Gewebe.

Organe	Entfärbungszeit in Minuten	
	Ohne Alkohol	Alkoholzusatz
Leber	38	29
Nierenrinde	112	105
Nierenmark	150	146
Herzmuskel	61	136
Lunge	∞	∞
Magen	∞	∞
Dünndarm	∞	∞
Dickdarm	∞	∞
Milz	∞	∞
Pankreas	∞	∞

Endes diese Verkürzung durch die Wirkung der Alkoholdehydrogenase verursacht wird.

Wie schon von vielen Forschern nachgewiesen worden ist, sind in der Leber verschiedene Reduktasen und Wasserstoffdonatoren vorhanden. Wird die Leber gründlich ausgewaschen, dann wird der grösste Teil dieser Donatoren vermindert und es geht gleichzeitig die Restreduktion verloren; aber auch die Alkoholoxydase verliert ihre fermentative Wirkung. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Verkürzung der Reduktionszeit beim Alkoholzusatz durch eine Aktivierung von seiten einer anderen Reduktase der Leber hervorgerufen wird, sodass der Alkohol keine Veränderung erleidet. Wenn der Alkohol dehydriert wird, dann entsteht nach folgender Formel Acetaldehyd:



Nach Beendigung des Versuches wird das Reaktionsgemisch durch etwas Tierkohle in ein Reagenzglas filtriert. Das klare Filtrat reagiert mit dem Schiff'schen Reagens purpurrot, die Aldehydreaktion fällt also positiv aus. Das Endprodukt ohne Alkoholzusatz reagiert negativ. Es ist daher ohne weiteres klar,

dass die verkürzte Reduktionszeit infolge von Alkoholzusatz durch die Alkoholoxydase verursacht wird. Es ist auch wichtig zu bemerken, dass Alkohol nicht in allen Organen direkt verbrennbar zu sein scheint. Vielleicht wird er zuerst in der Leber zu Acetaldehyd umgewandelt und dann leicht in anderen Organen verbrannt.

3. *Darstellung der Alkoholoxydase.*

Die Alkoholdehydrogenase ist äusserst labil. Wenn man die Leber einen Tag im Refrigerator aufbewahrt, so wird die Alkoholdehydrogenasewirkung stark abgeschwächt. Es ist daher sehr wünschenswert, ein stabiles Enzym-Präparat herzustellen. Nach vielen Versuchen gelang es mir ein solches zu erhalten, obwohl es immer noch nicht gänzlich befriedigend ausgefallen ist. Die Methode ist die folgende: Die Rinderleber wird so schnell wie möglich nach dem Schlachten gebraucht, entkapselt, von anderen Gewebsteilen befreit und dann mit der Cooper'schen Schere möglichst klein geschnitten. Die Stückchen werden dann 3–4 Stunden lang mit Wasser ausgewaschen, durch Leinwandtuch koliert, mit dem dreifachen Volum Aceton gemischt und dann 20 Minuten lang durchgeschüttelt. Der weisse Niederschlag wird abfiltriert und mittels Äther dreimal ausgewaschen. Der Rückstand wird im Vakuum über Chlorecalcium getrocknet. Man erhält so ein gelblichweisses Pulver. Dieses Präparat behält seine Wirksamkeit auch an der Luft bis 10 Tage lang, wie die folgende Tabelle II zeigt.

Diese Darstellungsmethode weicht von der Battelli und Stern'schen nur in der Behandlung mit Äther ab. Es besteht aber ein Unterschied in der Aktivität der Acetaldehydase beider Präparate. Wie von vielen Forschern bestätigt worden ist, ist die Aldehydase im Lebergewebe reichlich vorhanden. In den meisten Leberpräparaten ist die Entfärbungsgeschwindigkeit für Methylenblau durch Aldehydrase eine schnellere als durch Alkoholoxydase. In den folgenden Tabellen (III und IV) sind die Versuchsergebnisse mit dem in Wasser gründlich gewaschenen Präparate und dem nach Battelli und Stern mitgeteilt.

Mit den nach meiner Methode dargestellten Präparaten wurde

TABELLE II.

Die Stabilität der Alkoholoxydase.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Rindsleber	0.02 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 cem
	M/25 Äthylalkohol	0.5 cem
	M/5000 Methylenblau	je 0.3 cem
	Temperatur	39°C.

Entfärbungszeit

Zeitverl. n. d. Darstellg.	Ohne Alkoholzus.	Alkohol	Präparat- nummer
7 Tage	17' 25"	8' 15"	234
8	17' 30"	8' 50"	238
2	15' 15"	8' 25"	245
7	15' 57"	10' 06"	"
9	19' 50"	13' 42"	"
10	20' 35"	13' 46"	"
39	111' 50"	90' 27"	227

TABELLE III.

Reaktionsgemisch:	Rattenleberbrei	1.0 cem
	(Enthaltend 0.3 g Gewebe in 1.0 cem	
	Phosphatpuffer PH 6.24)	
	M/25 Äthylalkohol	1.0 cem
	M/25 Acetaldehyd	1.0 cem
	M/5000 Methylenblau	1.0 cem
	Temperatur	39°C

Entfärbungszeit

Ohne Zusatz	Alkohol	Aldehyd
34' 15"	22' 55"	19' 54"
35' 25"	26' 38"	19' 53"
32' 08"	25' 08"	14' 47"
37' 25"	29' 40"	14' 49"
38' 30"	27' 14"	16' 37"
37' 01"	26' 37"	11' 03"

nun ein ganz umgekehrtes Ergebnis erhalten, wie aus Tabelle V ersichtlich ist.

TABELLE IV.

Reaktionsgemisch: Trockenpräparate aus der Rinderleber, 0.03 g.
 die nach Battelli und Stern dargestellt wurden.
 Phosphatpuffer $\text{pH } 7.17$ 0.5 ccm
 Sonst wie im vorigen Versuche.

Ohne Zusatz	Alkohol	Aldehyd
20' 37"	10' 07"	8' 43"
18' 50"	11' 22"	9' 12"
18' 28"	13' 45"	12' 20"

TABELLE V.

Reaktionsgemisch: Trockenpräparate, je 0.02 g,
 welche nach meiner Methode dargestellt wurden.
 Sonst wie im vorigen Versuche.

Entfärbungszeit			
Ohne Zusatz	Alkohol	Aldehyd	Bemerkungen
19' 37"	8' 50"	13' 24"	Rinderleber
17' 13"	9' 53"	13' 00"	"
17' 10"	9' 20"	13' 37"	"
18' 00"	9' 08"	14' 32"	Rattenleber
14' 00"	7' 55"	13' 16"	"
15' 30"	7' 35"	12' 40"	"

4. Der Einfluss der Konzentration des Äthylalkohols.

Bei Untersuchungen über die Wirkung der Dehydrogenase spielt der Einfluss der Konzentration des Wasserstoffdonators eine grosse Rolle (Ahlgren). Aber nach Battelli und Stern(1910) hat die Alkoholkonzentration auf die Wirkung der Alkoholoxydase nur geringen Einfluss. Ich habe mittels meiner Methylenblau-methode einige Versuche mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen vorgenommen. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle VI zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei einer Alkohol-

TABELLE VI.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Rinderleber	0.02 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 ccm
	Äthylalkohol	0.5 ccm
	(von verschiedenen Konzentrationen)	
	M/5000 Methylenblau	0.3 ccm
	Temperatur	39° C

Konzentration	Entfärbungszeit
Ohne Alkohol	17' 25"
M/50	16' 12"
M/25	8' 15"
M/10	9' 17"
1 M	9' 45"
2 M	10' 45"
4 M	10' 28"
10 M	19' 52"
15 M	20' 05"

konzentration von 10 Mol und darüber eher eine Hemmung in der Wirkung der Alkoholoxydase verzeichnet wird, und dass die optimale Konzentration bei M/25 liegt.

5. Das Redox-Potential der Alkoholoxydase.

Durch die obigen Untersuchungen hat der Verfasser mit Sicherheit festgestellt, dass Alkohol durch ein Ferment der Leber dehydrogenetisch oxydiert wird. Dabei aktiviert das Ferment die H-Atome des Alkoholmoleküls und überträgt sie dem Methylenblau. Es ist aber fraglich, ob diese Aktivierung der H-Atome stattfinden kann, wenn ein H-Akzeptor wie das Methylenblau fehlt. Clark (1925) hat beim Schardingerenzym eine solche Aktivierung durch Potentiometrie festgestellt.

Kodama (1926) aber konnte diesen potentiometrischen Nachweis bei der Xanthinoxydase nicht erbringen. Dagegen wurde in Gegenwart von Methylenblau ein deutliches Reduktionspotential beobachtet. Es ist daher sehr interessant festzustellen, was für ein potentiometrisches Verhalten die Alkoholdehydrogenase zeigt. Zu diesem Zwecke hat der Verfasser das Vakuumelektroden-

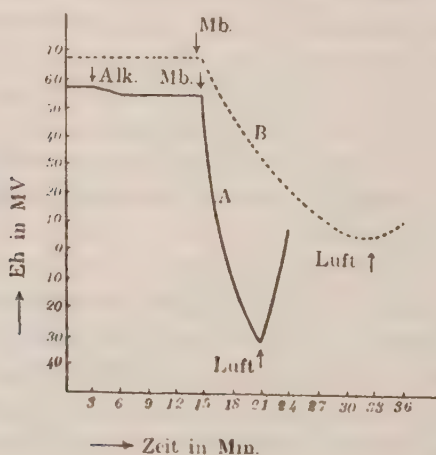
Gefäß nach Dixon-Kodama gebraucht, welches von Tsukano (1932) in dieser Zeitschrift eingehend beschrieben worden ist.

Als Elektrode wurde eine Goldplatte gebraucht und als Halbelemente die Quinhydronelektrode, dargestellt mit Acetatpuffer von P_{H} 4 und einer bestimmten Massen von Quinhydron-Kristallen.

Zuerst wurde nur Enzymlösung (0,2 g Trockenpräparat der Rinderleber in 10.0 ccm Phosphatpuffer, P_{H} 7.17) in das Elektroden-Gefäß eingebracht und einerseits ein Ansatz von 3.0 ccm von $M/5000$ Methylenblau und anderseits von 3.0 ccm von $M/25$ Alkohol hergestellt. Nach exakter Evakuierung wurde das genannte Gefäß in den Thermostaten (40°C) eingetaucht und das Potential mittels des Unipivat-Potentiometers von Cambridge gemessen.

Wenn das Potential einen konstanten Wert zeigte, wurde die Alkohollösung zugesetzt und die weitere Potential-Verschiebung beobachtet, doch war diese nur ganz gering. Wurde dann aber Methylenblaulösung zugesetzt, dann fiel das Reduktionspotential deutlich aus. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Kurve 1-A dargestellt. Der Kontroll-Versuch ohne Alkoholzusatz ist in der Kurve 1-B dargestellt. Beim Vergleich beider Kurven ersieht man deutlich, dass nach Alkoholzusatz eine schnellere und

Kurve 1.
Das Reduktionspotential der Alkoholoxydase.



viel tiefere Reduktionsphase erreicht werden kann, wenn Methylenblau zugesetzt wird.

6. *Untersuchungen mit an Alkohol gewöhnten Tieren.*

Es ist eine bekannte Tatsache, dass Alkohol beim habituellen Trinker schnell und gut verbrannt werden kann. Diese Erscheinung muss wohl der gesteigerten Aktivität der Alkoholoxydase des an Alkohol gewöhnten Gewebes zugeschrieben werden. Aber in dieser Hinsicht gehen die Meinungen der verschiedenen Forscher auseinander. Pringsheim (1908) fand, dass an Alkohol gewöhnte Kaninchen den Alkohol schneller zersetzen. Sieber-Schmowa (1910) teilten mit, dass die wiederholte Einführung kleiner Mengen Alkohol eine Erhöhung der Alkoholoxydasewirkung in der Leber und anderen Organen bewirkte, dass aber bei Einführung grosser Mengen das Gegenteil der Fall sei. Aber Battelli und Stern (1910) konnten in keinem einzigen Falle eine Steigerung der Alkohol oxydierenden Fähigkeit der Gewebe von an Alkohol gewöhnten Tieren finden. Auch Hirsch (1916) stellte fest, dass der Leberbrei von Tieren, die an hohe Alkoholdosen gewöhnt waren, den Alkohol in keinem grösserem Masse zersetzt als der von normalen Tieren. Verfasser hat bei normalen und bei durch dauernde Injektion von 0.5 ccm absolutem Alkohol während 16 Tagen allmählich an diesen gewöhnten Ratten einige Versuche vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle VII angegeben.

Die Methylenblauentfärbung ging also bei allen an Alkohol gewöhnten Ratten schneller vor sich.

7. *Über die Oxydation einiger aliphatischer einwertiger Alkohole.*

Äthylalkohol ist das beste Substrat für die Alkoholoxydase. Um nun festzustellen, wie andere aliphatische einwertige Alkohole durch die tierische Alkoholoxydase oxydiert werden, habe ich entsprechende Versuche mit Methyl- und Propylalkohol ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle VIII zusammengefasst.

TABELLE VII.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Rattenleber	0.2 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 ccm
	M/25 Äthylalkohol	0.5 ccm
	M/5000 Methylenblau	0.3 ccm
	Temperatur	39°C.

	Normale Ratte		Mit Alkohol behandelte Ratte	
	Ohne Alkohol	Alkohol	Ohne Alkohol	Alkohol
I.	15' 12"	8' 57"	15' 59"	6' 20"
II.	15' 33"	9' 30"	15' 12"	6' 24"
III.	15' 04"	8' 10"	15' 10"	6' 48"

TABELLE. VIII.

Oxydierbarkeit von Methyl- und Propyl-Alkohol.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Rinderleber	0.03 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 ccm
	Alkohol	0.5 ccm
	M/5000 Methylenblau	0.3 ccm
	Temperatur	39°C.

Konzentration	Entfärbungszeit	
	Methylalkohol	Propylalkohol
M/25	7' 17"	9' 05"
M/10	11' 18"	9' 25"
1 M	11' 15"	9' 50"
3 M	16' 08"	9' 58"
6 M	16' 24"	10' 51"
15 M	16' 43"	12' 20"
Ohne Alkohol	14' 15"	15' 04"
M/25 Äthylalkohol	6' 54"	6' 10"

Demnach besitzt also die Alkoholoxydase auch die Fähigkeit Methyl- und Propylalkohol zu oxydieren, doch ist die Oxydations-Geschwindigkeit bei diesem einwertigen Alkohol geringer als bei dem Äthylalkohol. Es ist zu erkennen, dass Methylalkohol in der gleichen Konzentration stärkere Vergiftungserscheinungen hervor-

ruft als Äthylalkohol, da der Methylalkohol gegen die Oxydation im Körper grössere Resistenzkraft besitzt.

8. Über die Oxydation der aliphatischen mehrwertigen Alkohole durch die Alkoholoxydase.

Verfasser hat zu diesen Versuchen Glykol, Glycerin, Erythrit und Sorbit verwendet. Als Alkoholoxydase wurden die Trockenpräparate von normalen Rindern und Ratten sowie von alkoholisierten Ratten gebraucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle IX zusammengefasst.

TABELLE IX.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Leber	0.2 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 cem
	M/25 Alkohol	0.5 cem
	M/5000 Methylenblau	0.3 cem
	Temperatur	39°C

Alkohol	Normale Rinderleber	Normale Rattenleber	Alkoholisierte Rattenleber*
Ohne Alkohol	20' 15"	20' 12"	18' 50"
Äthylalkohol	10' 51"	11' 03"	8' 40"
Glykol	15' 04"	17' 28"	23' 00"
Glycerin	15' 56"	19' 34"	23' 10"
Erythrit	16' 51"	17' 58"	21' 43"
Sorbit	16' 41"	16' 26"	20' 46"

* Der Ratte wurden einen Monat lang täglich 0.5 cem Äthylalkohol injiziert.

Aus der Tabelle geht hervor, dass beim Zusatz von mehrwertigen Alkoholen die Entfärbungszeit bei den normalen Tieren etwas verkürzt, bei den alkoholisierten Ratten dagegen mehr verzögert wurde. Verfasser hat weiter untersucht, ob in dem vorhergehenden Versuche aus dem Sorbit Glukose entsteht. Das Vorhandensein von Glukose in dem Reaktionsprodukt wurde mit der Hagedorn-Jensen'schen Blutzucker-Bestimmungsmethode geprüft.

Das Resultat war: 0.037 mg

0.028 „

0.040 „

Durchschnittlich 0.035 mg Zucker in 0.1 ccm Probe-
lösung (Sorbitgehalt 0.28 mg).

Es ist dem Verfasser ferner gelungen mittels der Fischer'schen Phenylhydrazin-Probe die Entstehung von Glukosazon-Kristallen nachzuweisen; falls kein Alkohol zugesetzt wurde, war jedoch diese Erscheinung nicht zu beobachten.

9. *Einfluss verschiedener Arzneimittel auf die Alkoholoxydase.*

a) Einfluss des KCN.

Seit Warburg seine Eisentheorie veröffentlichte, haben viele Autoren das KCN bei ihren Versuchen zur Entscheidung darüber angewendet, ob die Wirkung der Fermente durch Eisen oder andere Metalle unterstützt wird. Wenn im allgemeinen auch das KCN auf die echte Oxydase, z.B. die Indophenoloxydase, die Sauerstoff aktiviert, schädigend einwirkt, so ist es doch auf die die Wieland'sche Theorie bestätigende Dehydrogenase meistens unwirksam. Als gutes Beispiel dient hier die Xanthinoxydase, bei der die Methylenblau-Reduktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von KCN beschleunigt wird (Toyama). Studien über die Wirkung des KCN auf die Alkoholoxydase dürften daher von besonderem Interesse sein.

TABELLE X.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der normalen Rattenleber 0.02 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17) 0.5 ccm
	M/25 Äthylalkohol 0.5 ccm
	M/1000 Cyankaliumlösung 0.5 ccm
	M/5000 Methylenblaulösung 0.3 ccm
	Temperatur 39° C.

Zusatz	Entfärbungszeit
Ohne Zusatz	15' 12"
Äthylalkohol	8' 57"
KCN	20' 23"
Äthylalkohol + KCN	14' 57"

Nach den Ergebnissen meiner Untersuchungen wird die Wirkung der Alkoholdehydrogenase durch KCN zum Teil gehemmt (Tabelle X). Daraus geht also hervor, dass KCN auf den Sauerstoff- ebenso wie auf den Wasserstoff-Aktivierungsprozess hemmend einwirkt. Dieses Verhalten des KCN, das selbst reduzierende Wirkung besitzt, ist eine sehr interessante Tatsache.

b) Einfluss von Pyrrol.

Da das Pyrrol ebenso wie das KCN die Eigenschaft hat, sich mit verschiedenen Metallen leicht zu verbinden, hat der Verf. angenommen, dass es auch auf die Alkoholoxydase einen gewissen Einfluss ausübt. Von diesem Gedanken ausgehend hat der Verf. seine Untersuchungen angestellt, deren Ergebnisse in der Tabelle XI zusammengefasst sind. Es ist aus diesen Ergebnissen eine geringe, aber doch unverkennbare Hemmung der Alkoholoxydase durch das Pyrrol zu ersehen.

TABELLE XI.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der normalen Rattenleber 0.02 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17) 0.5 ccm
	M/25 Äthylalkohol 0.5 ccm
	M/25 Pyrrol!sung 0.5 ccm
	M/5000 Methylenblaulösung 0.3 ccm
	Temperatur 39°C.

Zusatz	Entfärbungszeit
Ohne Zusatz	15' 33"
Äthylalkohol	9' 30"
Pyrrol!sung	14' 25"
Äthylalkohol + Pyrrol!sung	11' 05"

c) Einfluss des Nebennierenrinden-Extrakts.

Wie Tsukano (1932) in unserem Institut zuerst festgestellt hat, ist das Nebennierenrindenextrakt ein kräftiges Coferment bei der Hexosephosphatdehydrogenase. Um nun festzustellen, ob das Nebennierenrindenextrakt auf die Alkoholoxydase irgendwelche aktivierende Wirkung hat, stellte der Verf. den folgenden Versuch

an:

TABELLE XII.

Reaktionsgemisch: Dasselbe wie beim vorigen Versuche.
Nebennierenrindenextrakt 0.5 ccm

Zusatz	Entfärbungszeit
Ohne Zusatz	15' 33"
Äthylalkohol	9' 30"
Nebennierenrinden-E.	5. 10"
Dt. + Äthylalkohol	3' 25"

Das Nebennierenrindenextrakt von Rindern ist also auch für das Lebergewebe ein guter Donator. Bemerkenswert ist an diesem Versuchsergebnis, dass bei Alkoholzusatz die Reduktionszeit weiterhin verkürzt wird, welche Erscheinung nicht ohne weiteres der Coferment-Wirkung des Extrakts zugeschrieben werden kann. Um weiter festzustellen, ob die Wirkung des Nebennierenrindenextrakts nicht etwa auf beigemengtes Adrenalin zurückzuführen ist, habe ich einen weiteren Versuch mit Adrenalin unternommen. Wie die in Tabelle XIII zusammengefassten Resultate zeigen, fehlt dem Adrenalin eine derartige aktivierende Wirkung vollständig.

TABELLE XIII.

Reaktionsgemisch: Dasselbe wie in den vorhergehenden Versuchen.
1: 1000 Adrenalin 0.5 ccm

Zusatz	Entfärbungszeit
Ohne Zusatz	15' 33"
Alkohol	9' 30"
Adrenalin	16' 22"
Alkohol + Adrenalin	12' 30"

10. Einfluss der Ultraviolett- und Röntgen-Strahlen auf die Alkoholoxydase.

Der Beleuchtung mit Ultraviolett-Strahlen habe ich das

Präparat auf eine Stunde in einer Schale ausgesetzt. Da das ausgesetzte Feld auf 10°C erwärmt wurde, habe ich bei der Kontrolle bezüglich der Blosslegung, Erwärmung etc. in genau derselben Weise verfahren.

Bei der Bestrahlung mit Röntgen-Strahlen wurden die folgenden Bedingungen beobachtet: Bestrahlung während 1 Stunde, Temperatur 14°C, Brennstrecke 15 cm, kürzeste Wellenlänge 0.088 Å und Filter eine 2 mm starke Pappscheibe. Die Kontrolle wurde entsprechend ohne Bestrahlung behandelt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle XIV zusammengefasst.

Aus den Versuchen geht hervor, dass beide Arten Strahlen auf die Alkoholoxydase hemmend wirken.

TABELLE XIV.

Reaktionsgemisch:	Trockenpräparat der Rinderleber	je 0.02 g
	Phosphatpuffer (PH 7.17)	0.5 ccm
	M/25 Äthylalkohol	0.5 ccm
	M/5000 Methylenblaulösung	je 0.5 ccm
	Temperatur	39°C

Zusatz	Entfärbungszeit	Bemerkungen
Ohne Zusatz	16' 43"	Ultraviolett-Strahlen
Alkohol	8' 50"	
Alkohol (beleuchtet)	∞	
Ohne Zusatz	19' 35"	Röntgen-Strahlen
Alkohol	13' 53"	
Alkohol (beleuchtet)	44' 49"	

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das Vorkommen der Alkoholoxydase ist fast ganz auf die Leber beschränkt; in anderen Organen wird sie nur in sehr geringem Umfange oder überhaupt nicht beobachtet.

2. Äthylalkohol wird durch die Alkoholoxydase am schärfsten angegriffen. Durch dehydrogenetische Oxydation wird er in Acetaldehyd verwandelt. In der Konzentration von M/25 gehen diese Vorgänge im Optimum vor sich.

3. Die Alkoholoxydase wirkt auch auf den Methyl- und Propylalkohol und ebenso auch auf Glykol, Glyzerin, Erythrit und Sorbit, wobei Zucker entsteht.

4. KCN und Pyrrol wirken auf die Alkoholoxydase hemmend. Das Nebennierenrindenextrakt befördert die Alkoholoxydase-wirkung, aber Adrenalin wirkt schädigend.

5. Ultraviolette und Röntgen-Strahlen hemmen die Wirkung der Alkoholoxydase.

6. Die Alkoholoxydase wird als Trockenpräparat dargestellt und durch Äther in einem mehr stabilen Zustande erhalten.

7. In Gegenwart von Methylenblau zeigt die Alkoholoxydase ein deutliches Reduktionspotential.

8. Es besteht ein Unterschied bezgl. der Alkoholoxydase-wirkung bei normalen und alkoholisierten Tieren; bei den letzteren ist ihre Wirkung stärker.

Am Schlusse dieser Ausführungen ist es mir ein aufrichtiges Bedürfnis den Herren Prof. Dr. K. Kodama und Prof. Dr. N. Onodera für freundliche Anregung und Leitung bei meinen Untersuchungen meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Ahlgren, G. (1925): Skandin. Arch. f. Physiol., Suppl., 47.
 Battelli, F. und Stern, L. (1910): Biochem. Zeitschr., 28, 145.
 Dabn. (1910): Biochem. Zeitschr., 29, 130.
 Dabn. in Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkung, 11, 1345-48.
 Dabn. (1921): Arch. internat. d. Physiol., 18, 403.
 Hirsch, J. (1916): Biochem. Zeitschr., 77, 129.
 Kodama, K. (1926): Biochem. J., 20, 1095.
 Pringsheim, J. (1908): Biochem. Zeitschr., 12, 143.
 Sieber-Schmowa (1910): Zentralbl. f. Biochem., 12, 3058.
 Tsukano, M. (1932): The Journ. of biochem., 15, 487.
 Wieland, H. (1912): Ber. d. deutsch. chem. Ges., 45.
 Debn. Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1912, 45; 1914, 47; 1921, 54.
 Wieland, H. und Frage, K. (1930): Hoppe-Seylers Ztschr., 186, 195.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES. I.

A Micromethod of Determination of Menthol-, Borneol- and β -Naphtholglucuronic Acid in Blood.

By

HAJIME MASAMUNE.

(From the *Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama*)

(Received for publication, June 26, 1933)

The method of the estimation of the conjugated glucuronic acids in blood was developed by Händel (1924). The principle of this method lies in precipitating the acid as a lead compound, and then determining the amount of furfural by the treatment of this precipitate with concentrated HCl. According to my experience, however, some acids, for instance, benzoyl- and mentholglucuronic acids, are not precipitated completely by basic lead acetate and ammonia. And the yield of furfural from various conjugated glucuronic acids is not constant and so scarce that it corresponds only to about one third of the theoretical. Therefore, a large volume of blood should be taken for analysis. Händel applied 100 cc. blood for one analysis. Recently Miyazaki (1929) made use of the reduction method and the optical rotation measurement in determining camphor glucuronic acid in blood, but the method is pretty complicated and of large scale, and, as the author himself mentioned, the blood volume applied was not definite. Quick (1924) introduced a method of analysing urinary mentholglucuronic acid which was claimed to be satisfactory in accuracy. The principle of this method consists of extracting with ether, following by hydrolysis and then determining the reduction power of the hydrolysis product. The present author tried whether this method could be applied to blood or not and after many trials it was found that the method modified in certain respects gives a fairly correct value for mentholglucuronic acid in blood. Owing to the difference in extractibility with ether and in the resistance

for acid hydrolysis, the method can not be applied generally for other conjugated glucuronic acids. But under certain precautions the method is available, the details of which will be described in the text.

REAGENTS.

1. Absolute alcohol: Commercial pure absolute alcohol ("Alcohol anhydricus" of Dainippon Seiyaku Kabushikikaisha) is enough.

2. 0.1 n NaOH solution.

3. 1 mol H_2SO_4 solution.

4. 4% Cadmiumsulfate (Kahlbaum, for arsenic determination) solution.

5. Ether: 3 liters commercial ether is added with 300 gm KOH in powdered form and let stand for 1-2 days with occasional shaking and then distilled. The fraction boiling at 35°C is collected for use. It is better kept in the dark.

6. 4 n HCl solution.

7. 2 n NaOH solution.

8. 0.005 n ferricyanide solution of Fujita and Iwatake (1931). The solution was prepared by dissolving 0.164 gm $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 14.0 gm K_2HPO_4 and 4.2 gm K_3PO_4 in distilled water and diluting to 100 cc. It should be kept in the dark.

9. Salt mixture of Hagendorn and Jensen. 2.5 gm KI, 5.0 gm $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 25.0 gm NaCl were dissolved in distilled water and made up to 100 cc.

10. 6.2% HCl solution 1 part of concentrated HCl (sp. gr. 1.19) is diluted with 5 parts of distilled water.

11. 0.005 n sodium thiosulfate solution.

12. 1% solution of soluble starch saturated with NaCl or with KCl.

APPARATUS.

A small Kumakawa and Suto's apparatus was used for ether extraction. The tubelet to be inserted in the extraction tube has five small outlet holes of the diameter of about 0.5 mm. The

size of the extraction tube is 1.5 cm wide and 10.5 cm high under the side arm. A test tube of the size 20 cm \times 3 cm which is graduated at 8 cc was substituted for the Ether vessel.

PROCEDURE.

Lake 1 cc. blood with 1 cc. water, fill up to 10 cc. with absolute alcohol and filter after shaking a while. Pipette 5 cc. filtrate into a beaker of 50 cc. capacity and evaporate gently on the lid of a boiling bath. The dried up residue is dissolved in 3 cc. 0.1 n NaOH by scratching off the lipoids, which adhered to the inside of the container and then added 1 cc. 4% cadmiumsulfate solution under shaking. The mixture should be neutral to litmus.

Filter it through a long stemmed funnel into the extraction tube of Kumakawa and Suto's apparatus, wash with two 3.7 cc. portions of water, and then add 1 cc. 1 mol sulfuric acid. Transfer 20 cc. ether and a few pieces of emery sand into the lower vessel. On fitting up the apparatus, the bath temperature is raised and regulated between 50 and 70 degrees Celsius, so that ether flows back at the rate of 30 to 40 drops per 10 seconds. Extraction is stopped after 1 hour in case of menthol- and borneol glucuronic acid and after 3 hours if β -naphtholglucuronic acid is to be analysed. Evaporate ether, add 6 cc. water and expel the volatile reducing products of ether by placing the test tube for 20 minutes in the boiling water. Cool, add 2 cc. 4 n HCl, fill up to 8 cc. with water and fix the air reflux condensor (glind-joint). Menthol- or borneolglucuronic acid is hydrolysed by placing it again for 30 minutes in the boiling bath and β -naphtholglucuronic acid for 3 hours. Cool under the running water and neutralize exactly with 2 n NaOH. About 4 cc. is required. A slight excess of alkali doesn't spoil the analysis.

Then add 4 cc. 0.005 n ferricyanide solution and heat in boiling water for 15 minutes, cool, add 3 cc. of the salt mixture and 4 cc. 6.2% hydrochloric acid solution and then titrate with 0.005 n thiosulfate solution using soluble starch as an indicator.

CALCULATION.

The amount of a conjugated glucuronic acid in 100 cc. blood is calculated from the equation

$$\left. \begin{array}{l} \text{borneolglucuronic acid in terms} \\ \text{of glucuronic acid in mg} \end{array} \right\} = \frac{200}{5.6} \times \left\{ \begin{array}{l} \text{number of cc. 0.005 n ferricyanide} \\ \text{solution reduced} \end{array} \right.$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{mentholglucuronic acid in} \\ \text{terms of glucuronic acid} \\ \text{in mg} \end{array} \right\} = \frac{200}{5.6 \times 0.989} \times \left\{ \begin{array}{l} \text{number of cc. 0.005 n ferri-} \\ \text{cyanide solution reduced} \end{array} \right.$$

$$\left. \begin{array}{l} \beta\text{-naphtholglucuronic acid} \\ \text{in terms of glucuronic} \\ \text{acid in mg} \end{array} \right\} = \frac{200}{5.6 \times 0.983} \times \left\{ \begin{array}{l} \text{number of cc 0.005 n ferricyanide} \\ \text{solution reduced} - \text{that reduced} \\ \text{by the blood collected in advance} \\ \text{of transferring } \beta\text{-naphthol} \end{array} \right.$$

When conditions of the experiment don't allow obtaining the blood before giving β -naphthol or alikes which cause the production of β -naphtholglucuronic acid, the calculation made in the last case without subtraction of this blanc gives only an approximate value,

EXPERIMENTS AND REMARKS.

1. Preparation of sodium borneolglucuronate, menthol-, β -naphthol-, phenolglucuronic acid and free glucuronic acid:

Sodium borneolglucuronate—Its zinc salt was prepared according to Quick (1927). 100 gm crude zinc salt was suspended in a liter of 1.2 n sulfuric acid solution and extracted several times with 500 cc. ether. The ether extracts were combined and evaporated after being dried with anhydrous sodium sulfate. About 60 gm crystalline residue was obtained. It was dissolved in 400 cc. water, neutralized with 85 cc. 2 n sodium hydroxide solution and condensed to a small volume until crystallisation began. It was then cooled and absolute alcohol was added to it. The crystals were collected in a Buchner's funnel, dissolved again in a possibly small amount of hot water, treated with Norite, filtered hot and to the filtrate sufficient amount of alcohol was added. On standing, the sodium salt of borneolglucuronic acid crystalized out in the form of needles. Yield, 45 gm. The air dry sample contains $2\frac{1}{2}$ molecules water of crystallization. The rotation of the air dried

salt in water is $[\alpha]_D^{25} = -0.89 \times 3.0967/1 \times 0.1079 \times 1.011 = -25.3^\circ$.

Menthol glucuronic acid—50 gm crude ammonium salt, prepared according to the method of C. Neuberg and S. Lachman (1910) modified by I. Bang (1911), were dissolved in 500 cc. water by slight warming, cooled and acidified with 62.5 cc. 2 mol sulfuric acid. The mixture was kept over night in the ice chest and the crystals were collected in a Buchner's funnel and washed twice with 50 cc. 0.1 mol sulfuric acid and finally with an equal volume of cooled water. Recrystallization was done from water. It contained in an air dried state 2 molecules of crystal water. The yield was 40 gm. Mentholglucuronic acid free from crystall water sinters at 90° and melts at 109°C . From the mother liquid a few grams of the acid can still be obtained by extraction with ether. The ether was evaporated and the residue was dissolved in 20 cc. water, acidified with 5 cc. of 1 n sulfuric acid and let stand till complete crystallisation.

β -naphtholglucuronic acid—Urine of rabbits, each given daily 2 gm β -naphthol with food, was acidified with glacial acetic acid, added to with a saturated lead acetate solution until no more precipitation occurred and filtered. The filtrate was neutralised with 20% ammonia and treated by saturated basic lead acetate solution, upon which β -naphthol glucuronic acid was precipitated. This was collected in the Buchner's funnel, washed with ice-cold water and dried on a clay plate. It was then liberated from the lead salt by mixing the latter with cooled hydrochloric acid (sp. gr. 1.12) to a paste.

The addition of hydrochloric acid should be made in small portions by stirring in the ice water. The paste was transferred again into the Buchner's funnel and submitted to suction, and the residue on the funnel was washed with a little cold water, pressed and dried between clean papers. Then the latter was extracted with ether in a Soxhlet's apparatus. The crystalline residue was made free of ether, dried, and let stand over night in contact with chloroform. The latter was decanted off. Recrystallization was tried from hot water, after removing the colored impurities with charcoal. The daily yield from one rabbit was on the average

0.46 gm. The airdried sample contained 2 molecules of crystal water. It loses crystal water at 100°C and melts at 150°C .

Phenolglucuronic acid—0.5 gm phenol (1% solution) was administered daily to rabbits by means of a stomach tube. Lead salt of phenolglucuronic acid was prepared as described above from the urine filtrate, alkalisied with excess of ammonia. It was then suspended in water and treated with H_2S gas. The PbS was filtered off and the filtrate was condensed under reduced pressure at the temperature below 40°C , whereupon the phenolglucuronic acid crystallized out. Complete drying of the residue should be avoided as it is liable to decompose by oxidation. For further purification, the crystals were dried on a porous plate, treated with ether to remove the contaminating hippuric acid and recrystallized repeatedly from hot acetic ester after being decolorised with charcoal. It is hygroscopic and after being dried in vacuo at 78°C , melts at 160°C under decomposition. The daily yield from one rabbit was on the average 0.35 gm.

Glucuronic acid—18 gm pure mentholglucuronic acid were dissolved in 300 cc. 0.2 n sulfuric acid and boiled under reflux condenser for 7 hours—addition of a minute quantity of alcohol and of tale was very effective for dissolving menthol adhering to the inside of the condensor and for keeping the boiling smooth. A small portion of the mother liquid separated from menthol was taken out and determined on its reduction power in order to know the concentration of freed glucuronic acid. Sulfuric acid was neutralized to litmus with saturated barium hydroxide solution; then sufficient amount of 1 mol sulfuric acid was added again which sets free all the glucuronic acid calculated from the reduction power. A slight excess of sulfuric acid does not interfere with its isolation. Barium sulfate was centrifuged off and to the supernatant liquid was added 2–3 spoonfuls of charcoal and again centrifuged. Then the clear fluid was shaken three times with 100 cc. ether and evaporated in vacuo at a tempearture below 40°C . Crystallisation began often during evaporation and always when the syrupy residue was kept in a vacuum dessicator above P_2O_5 over night.

The crystals were washed several times with 100 cc. of absolute alcohol by letting them stand each time for one day, and finally with ether. It melts at 160°C under decomposition and gas evolution. The yield was 3.6–5.9 gm, that is, 38–62% of the theoretical when no lactone was formed.

2. In analysis of non-protein blood constituents, one of the most important things is to use a proper deproteinizing agent. And this is especially the case when the determination of menthol-glucuronic acid is tried, because, for example, uranylacetate retains over 90% of the substance with the protein coagulum.

Several reagents were examined and alcohol was found most appropriate, as is shown in table I. Namely 100 per cent of the added acid was recovered in the case of alcohol.

In cases 1 to 4, 10 cc. filtrate was pipetted into the extraction apparatus. But in the last case where alcohol was used the same volume of the filtrate was evaporated instead of 5 cc. and the residue was then submitted for extraction with ether. In all cases this was performed after the addition of 1 cc. 1 mol sulfuric acid and continued for one hour. The ether was evaporated off and the residue was added with 4 cc. water and 4 cc. 2 n hydrochloric acid and heated in the boiling water bath without joining the condenser. 25 minutes were enough to result in complete hydrolysis. It was cooled, filled with water up to 8 cc., neutralized with 2 n sodium hydroxide solution and then the reduction power was determined. The blank was obtained by carrying out the whole determination with water instead of blood.

3. *Reduction power of glucuronic acid.* A measured quantity (0.1–1.4 cc.) of 0.05 per cent glucuronic acid solution was taken into a large test tube, diluted to 14 cc. with water and added with 4 cc. of 0.005 n ferricyanide solution of Fujita and Iwatake, and the reduction power was determined as is described already in the section on procedure. For comparison, glucose was tested in a similar way. It can be seen from table II. and Fig. 1. that the reduced amounts of ferricyanide are straight line functions of those of glucuronic acid and of glucose applied. And the slopes of these lines are 0.56 and 0.6 respectively. The number of mg. of glucuronic

TABLE I.

Method of deproteinizing	Fujita & Iwatake's method	Folin & Wu's method	Uranylacetate *	Phosphormolybdic acid †	Alcohol ‡
blood volume (cc.)	2	2	2	$\begin{cases} a \\ 2 \end{cases}$	$\begin{cases} 2 \\ 2 \end{cases}$
blood dilution	$\times 10$	$\times 10$	$\times 10$	$\begin{cases} b \\ 2 \end{cases}$	$\begin{cases} 2 \\ \times 10 \end{cases}$
quantity of added mentholglucuronic acid (air dried, $C_{12}H_{22}O_7 + 2H_2O$) in terms of glucuronic acid (mg.)	0.226	0.452	0.424	$\times 10$	$\times 10$
filtrate extracted (cc.)	10	10	10	0.370	0.401
recovered (mg.)	0.077 (68%)	0.157 (69.5%)	0.037 (8.7%)	0.155 (83.8%)	0.201 (100.0%)
		0.185 (82.2%)		0.147 (79.9%)	0.197 (99.5%)

* To 2 cc. blood were added 1 cc. mentholglucuronic acid solution, 1 cc. water, and 16 cc. 1% uranylacetate solution. The whole was shaken well and filtered after 30 minutes. 10 cc. of the filtrate was applied for extraction.

† In the first case (a) to 2 cc. blood were added 1 cc. mentholglucuronic acid solution and 17 cc. phosphormolybdic acid reagent of Rang. In (b) to 2 cc. blood were added 2 cc. mentholglucuronic acid solution and 16 cc. of the Bang's reagent of the concentration one and a half times that of the above used.

‡ Of the deproteinized filtrate 10 cc. were taken for analysis.

acid in the test solution can be calculated from the equation

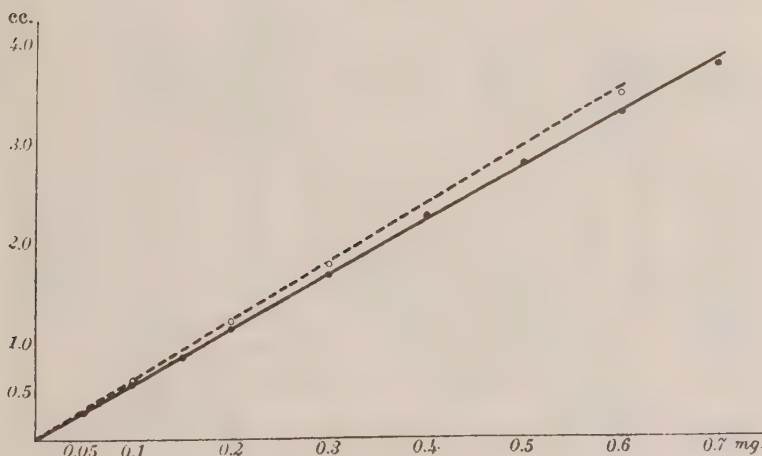
$$\text{glucuronic acid} = \frac{1}{5.6} \times \frac{\text{number of cc. 0.005 n ferricyanide}}{\text{in mg solution reduced}}$$

The ratio of reduction powers of the two compounds $0.56/0.6=0.93$ which is in inverse proportion to that of their molecular weights.

TABLE II.

glucuronic acid mg	number of cc. 0.005 n ferricyanide solution reduced	glucose mg.	number of cc. 0.005 n ferricyanide solution reduced
0.05	0.28		
0.1	0.56	0.1	6.0
0.15	0.85		
0.2	1.12	0.2	1.20
0.3	1.67	0.3	1.77
0.4	2.28		
0.5	2.80		
0.6	3.34	0.6	3.54
0.7	3.82		

Fig. 1.



4. Hydrolysis velocities of conjugated glucuronic acids varied according to their combined components as table III shows.

Hydrolysis was carried out in 14 cc. 1 n hydrochloric acid at 100°C. The velocity showed nearly the order of unimolecular reaction, so that the reactions constants were calculated and from their average value are the curves in fig. 2. drawn on the basis

of the formula $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$. According to these curves are 98.9

and 99.7 per cent mentholglucuronic acid hydrolysed in 30 and 40 minutes respectively, 99.8 per cent borneolglucuronic acid in 30 minutes, 98.3 per cent β -naphtholglucuronic acid in 3 hours and phenolglucuronic acid to the extent of 97.4 per cent in an equal period of time.

5. *Extraction velocities of the conjugated glucuronic acids:*

The acid solution was pipetted into the middle tube of the apparatus and diluted with water up to 10 cc., acidified with 1 cc.

TABLE III.
Mentholglucuronic acid
(air dried, $C_{16}H_{26}O_7 + 2H_2O$)

analysed: 1.33 mg 0.7 mg in terms of glucuronic acid				0.190 mg 0.1 mg in terms of glucuronic acid		
time (minutes)	number of cc. of 0.005 n ferricya- nide solution reduced	percen- tage of the hydro- lysed	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	number of cc. of 0.005 n ferricya- nide solution reduced	percen- tage of the hydro- lysed	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a-x}{a}$
5	1.96	50.5	0.1405	0.28	50	0.1383
10	3.15	81.1	0.1667	0.44	78.5	0.1538
20	3.77	97.1	0.1769	0.51	91	0.1204
30	3.89	100.2	0.1614	0.56	100	0.1375
40	3.88	100	(average)	0.57	101.8	(average)
50	3.88	100		0.56	100	
60	3.82	100.2		0.55	98.2	
				$\frac{0.1614 + 0.1375}{2} = 0.1495$		

Na-borneolglucuronate
(air dried, $C_{16}H_{25}O_7Na + 2\frac{1}{2}H_2O$)

analysed: 1.3 mg 0.649 mg in terms of glucuronic acid				0.1908 mg 0.095 mg in terms of glucuronic acid		
5	2.29	63.6	0.2025	0.39	74	0.2695
10	3.27	90.8	0.2385	0.47	89.3	0.2235
20	3.51	97.5	0.1903	0.51	96.8	0.1683
30	3.52	97.8	0.2104	0.52	98.7	0.2204
40	3.52	97.8	(average)	0.53	100	(average)
				$\frac{0.2104 + 0.2204}{2} = 0.2154$		

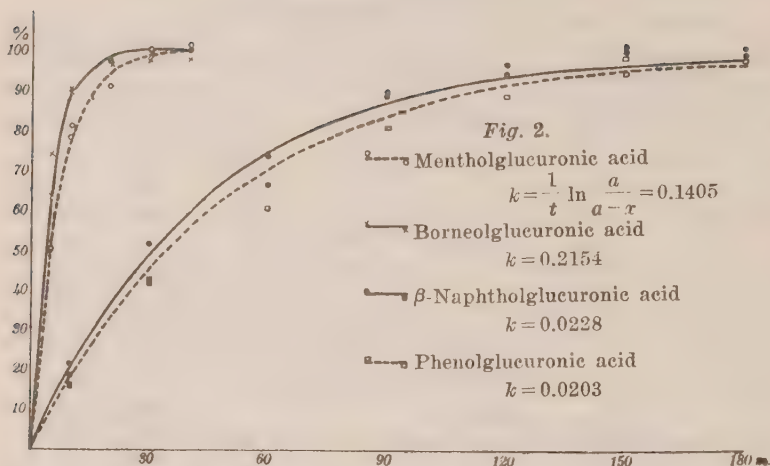
β -Naphtholglucuronic acid
(air dried, $C_{16}H_{16}O_7 + 2H_2O$)

analysed: 1.285 mg 0.7 mg in terms of glucuronic acid				0.1835 mg 0.1 mg in terms of glucuronic acid		
10	0.71	18.3	0.0202	0.12	21.4	0.0248
30	1.64	42.3	0.0184	0.29	51.8	0.0243
60	2.58	66.5	0.0182	0.41	73.2	0.0220
90	3.42	88.1	0.0236	0.50	89.3	0.0250
120	3.67	94.6	0.0238	0.54	96.4	0.0278
150	3.97	101.8	0.0208	0.56	100	0.0248
180	3.98	101.8	(average)	0.56	100	(average)
				$\frac{0.0208 + 0.0248}{2} = 0.0228$		

Phenolglucuronic acid
($C_{12}H_{14}O_7$)

analysed 0.974 mg 0.7 mg in terms of glucuronic acid				0.1391 mg 0.1 mg in terms of glucuronic acid		
10	0.62	16.0	0.0174	0.09	16.1	0.0176
30	1.61	41.5	0.0179	0.24	42.8	0.0187
60	2.33	60.1	0.0156	0.41	73.2	0.0220
90	3.11	80.2	0.0179	0.51	91.0	0.0274
120	3.42	88.2	0.0178	0.53	94.6	0.0243
150	3.67	94.7	0.0196	0.55	98.2	0.0268
180	3.83	98.8	0.0177	0.56	100	0.0228
210	3.84	99.0	(average)	0.57	101.8	(average)
				$\frac{0.0177 + 0.0228}{2} = 0.0203$		

Fig. 2.



1 mol sulfuric acid and extracted with 20 cc. ether. The circulation of ether was so regulated as to flow back into the lower tube at the rate of 30 to 40 drops per 10 seconds. Menthol- and borneolglucuronic acid could be extracted completely in 1 hour and β -naphtholglucuronic acid in 3 hours. The solubility of phenolglucuronic acid in ether is extremely small and even in 5 hours went over only its 49 to 54.8% into ether. Although the extraction velocity is not strictly constant, yet we are justified in concluding from a number of experiments that it runs as monomolecular reaction and the constant calculated showed a fairly satisfactory value. When now an aqueous solution of a conjugated glucuronic acid is shaken with ether and if a is its concentration in ether and b that in acidified water, $a/b=C$ is the quotient of partition between the two solvents. And if the volume of ether is equal to that of water, $a/a+b=C'$ is the extraction percentage and constant. Let, in our case, v be the volume of ether passing through the water layer in a unit time expressed in percentage of the water volume, and further let f be the concentration of the extracted in terms of fraction of that in equilibrium, then

$$f.v.C' = k$$

is the extraction rate under the conditions of the experiment. The

extraction velocity dx/dt can be, therefore, expressed in the equation of an unimolecular reaction.

$$\frac{dx}{dt} = k(i - x)$$

i is the initial concentration.

k calculated from the average quantity of ferricyanide solution which is reduced is 0.0028 and extraction percentages according to this value of k are 28.5, 39.7, 48.5, and 57% in 60, 120, 180, 240 and 300 minutes respectively.

TABLE IV.

Mentholglucuronic acid				
analysed: 1.125 mg			0.1877 mg	
time	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted
30	3.17	94.4	5.5	90.0
60	3.35	99.7	5.6	100.0
90	3.37	100.3	5.6	100.0
120	3.33	99.2	5.7	101.8
180	3.36	100.0	5.5	99.0

Na-borneolglucuronate				
analysed: 1.26 mg			0.2 mg	
time	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted
30	3.19	90.3	0.52	92.8
60	3.52	99.7	0.55	98.2
120	3.53	100.0	0.57	101.7
180	3.47	98.3	0.57	101.7

β -naphtholglucuronic acid				
analysed: 1.283 mg			0.1835 mg	
time	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced	percentage of the extracted
30	2.37	60.5	0.28	50.0
60	3.09	78.8	0.41	73.2
120	3.52	96.7	0.52	92.8
180	3.90	99.4	0.57	101.8
300	3.82	97.4	0.56	100.0

Phenolglucuronic acid
0.834 mg

time	no. of cc. 0.005 n ferri- cyanide solu- tion reduced.	percentage of the extracted <div style="text-align: center;">average</div>	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ <div style="text-align: center;">average</div>	percentage to be extracted according to $k = 0.0028$
60	5.97	17.3	0.0028	15.6
	5.42	15.7		
	5.31	15.4		
	5.21	15.1		
	5.14	14.9		
	4.97	14.4		
120	11.9	34.4	0.0032	28.5
	11.0	31.9		
	10.8	31.2		
	10.8	31.2		
180	13.5	39.2	0.0026 0.0028	39.7
	13.8	37.2		
	12.6	36.5		
	12.6	36.5		
	12.7	36.8		
240	18.3	53.2	0.0029	48.5
	18.2	52.9		
	18.1	52.5		
	16.6	48.0		
	16.2	47.1		
300	18.9	54.8	0.0025	57.0
	17.8	51.5		
	18.6	53.8		
	17.9	51.9		

Table V. shows that 37.9 and 40% of phenolglucuronic acid added to the blood was recovered by 3 hours extraction followed by 3 hours hydrolysis and 7.4 and 8% by 1 hour extraction and $\frac{1}{2}$ hour hydrolysis.

The results of borneol- and β -naphtholglucuronic acid are also

TABLE V.

Phenolglucuronic acid:		
blood volume (cc.)	2.	2.
added phenolglucuronic acid in terms of glucuronic acid (mg)	1.090	0.364
filtrate analysed (cc.)	10	10
recovered, [extraction 3 h. hydrolysis 3 h.] (theoretically 39.7%)	0.207 mg (37.9%)	0.080 mg (44%)
[extraction 1 h. hydrolysis ½ h.] (theoretically 7.1%)	0.040 mg (7.3%)	0.015 mg (8%)
Borneolglucuronic acid:		
blood volume (cc.)	2.	2.
added sodiumborneolglucuronate in terms of glucuronic acid (mg)	1.144	0.191
filtrate analysed (cc.)	10	10
recovered [extraction 1 h. hydrolysis 30 m.]	0.605 mg (106%)	0.097 mg (101.6%)
β-Naphtholglucuronic acid:		
blood volume (cc.)	2.	2.
added β-naphtholglucuronic acid in terms of glucuronic acid (mg)	1.434	0.239
filtrate analysed (cc.)	10	10
recovered [extraction 3 h. hydrolysis 3 h.]	0.703 mg (98%)	0.120 mg (100%)

given in the same table. The method is quite the same as is described above, except that 2 cc. blood was used instead of 1 cc. The blanc test was carried out with the blood without any addition of conjugated glucuronic acid.

6. It was investigated further whether or not any other reducing substances in blood go over into ether. Following substances were examined: creatine (30 mg% solution), creatinine (35 mg% solution), uric acid (25 mg% solution, dissolved with an equivalent quantity of 0.1 n NaOH), dextrose (500 mg% solution), reduced glutathione (100 mg% solution) (Piril, 1930), thioneine

(100 mg% solution) (Eagles, 1928), and lactose (50 mg% solution). 2 cc. of each solution were added to an equal volume of blood and deproteinized by adding absolute alcohol up to 20 cc. The evaporated residue was treated further in the same manner, as above mentioned, but hydrolysis was omitted.

Both 1 and 3 hours extractions were performed with each substance, but no trace of them was found extracted. In addition, glycogen (25 mg% solution) was tested. 0.25 mg glycogen could be hydrolysed completely in 30 minutes and reduced 1.36 cc. 0.005 n ferricyanide solution. The ether residue was, therefore, submitted to hydrolysis for the same duration, but the experiment lead to the same result.

7. The physiological blood content of glucuronic acid lactone is according to Händel from 1.8 to 6 mg in 100 cc. dog's blood. It is thought to be present chiefly in conjugated form with phenol. If this acid is assumed to be the sole representative in normal blood, one can calculate the content of glucuronic acid in 100 cc. blood from the equation

$$\begin{array}{l} \text{mg. conj. glucuronic} \quad \text{number of cc. 0.005 n ferricyanide} \\ \text{acid in normal blood} \quad \text{solution reduced by 0.5 cc. blood} \\ \text{in terms of glucuron-} = \text{after three hours extraction and} \\ \text{ic acid} \quad \quad \quad \text{three hours hydrolysis} \\ \\ \times \frac{200}{0.397 \times 5.6 \times 0.974} \end{array}$$

The actual value which was obtained by the author's method with 1 cc. of blood ranges from 0 to 7.3 mg (table VI.) The blank was obtained by carrying out the whole determination but by replacing blood with water. When extraction was shortened to 1 hour and hydrolysis to $\frac{1}{2}$ hour, the volume of ferricyanide solution to be reduced corresponds theoretically only to 7.1% [0.156(extracted) \times 0.455(hydrolysed) = 0.071] of the amount present in blood, that is, to 0.01 cc.

$$7.3 \times 0.005 \times 0.071 \times 5.6 = 0.01 \text{ cc.}$$

It doesn't, therefore, reach beyond the experimental error. Experiments proved this.

TABLE VI.

The physiological content of glucuronic acids as assumed all to be phenolglucuronic acid:

	mg. glucuronic acid in 100 cc.			
	1.8	4.5	7.3	1.8
guinea-pig.	1.8	2.7	3.6	
rabbit	3.6	1.8	1.8	
ox	0	0		
pig	0	3.7		
pigeon	5.5 (♀)	0 (♂)		
fowl				

8. The formula of calculation assumes that the amount of the physiological glucuronic acid does not fluctuate during the experiment, and it is probably so in most cases, judging from the fact that Miyazaki has observed that camphor injection had no effect upon the content of blood conjugated phenol.

9. Any of the named three conjugated glucuronic acids can be determined accurately in so small quantity as 10 mg per cent in terms of glucuronic acid.

SUMMARY.

1. A micromethod of determining menthol-, β -naphthol- and borneolglucuronic acid in blood has been described.

2. Preparation methods of menthol-, β -naphtholglucuronic acid, sodiumglucuronate, pheonlglucuronic acid and glucuronic acid also have been noted.

3. The glucuronic acid has the same molecular reducing power as glucose.

4. The hydrolysis constants of these four conjugated glucuronic acids in 1 n hydrochloric acid solution at 100°C are 0.1495, 0.2154, 0.0228 and 0.0203 respectively.

5. Blood of various animals was determined on the physiological content of conjugated glucuronic acids under the assumption that they consist solely of phenolglucuronic acid.

Thanks are due to Professor K. Kodama for his kind advice and unfailing interest.

REFERENCES.

- Bang, I. (1911): *Bioch. Z.*, **32**, 443.
Eagles B. A. (1928): *J. Americ. Chem. Soc.*, **50**, 1386.
Fujita A. and Iwatake, D. (1931): *Biochem. Z.*, **242**, 43.
Händel, M. (1924): *Z. f. ges. exp. Medizin*, **42** 178.
Miyazaki, S. (1929): *Mitteilungen a. d. mediz. Akademie z. Kioto*,
3, 25.
Neuberg C. u. Lachmann, S. (1910): *Bioch. Z.*, **24**, 416.
Piril, N. W. (1930): *Bioch. J.*, **24**, 50.
Quick, A. J. (1924): *J. of biolog. Chemistry*, **61**, 667.
Quick, A. J. (1927): *J. of biolog. Chemistry*, **74**, 331.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES. II.

A micro colorimetric method of determination of free and conjugated menthol in blood and tissues.

By

HAJIME MASAMUNE.

(From the *Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.* Director: Prof. K. Kodama)

(Received for publication, June 26, 1933)

The author has been engaged in the studies on conjugated glucuronic acids, and was laid under the necessity of devising a method for determining menthol free and conjugated in blood and tissues. It has been known that alcoholic solution of menthol develops red colour on being treated with benzoyl peroxide in conc. sulfuric acid. The author found that vanillin and dimethylaminobenzaldehyde give also violet and red colour respectively with menthol when heated in the presence of sulfuric acid. The last reaction was tried to make use of for quantitative determination.

PRINCIPLE.

Tissue or blood is made free from protein with alcohol. Free menthol in the filtrate is distilled with the solvent and the distillate is treated with dimethylaminobenzaldehyde and the colour developed is compared with the standard in a colorimeter. For the determination of combined menthol, the filtrate is evaporated on the boiling bath, whereby free menthol is removed and the residue is dissolved in a sodium hydroxide solution, added with cadmium sulfate solution and then filtered. The filtrate is treated further as the distillate above.

REAGENTS.

1. Absolute alcohol ("Alcohol anhydricus" of Dainippon Seiyaku Kabushiki Kaisha.)
2. Cadmium sulfate solution: 4 g Kahlbaum's cadmium sul-

fate for arsenic determination is dissolved in water and made up to 100 cc.

3. 0.1 n. sodium hydroxide solution.
4. Anhydrous sodium sulfate. (E. Merck.)
5. *p*-Dimethylaminobenzaldehyde solution:

Dilute 1.6 volume parts of conc. sulfuric acid with 1 part of water, and dissolve 0.5 g dimethylaminobenzaldehyde in 100 cc. of this diluted sulfuric acid and keep in a brown flask.

On standing, the solution becomes tinged yellow quickly in the daylight and after several days in the dark, whereupon it should be renewed.

6. Phenol red solution as artificial standard.

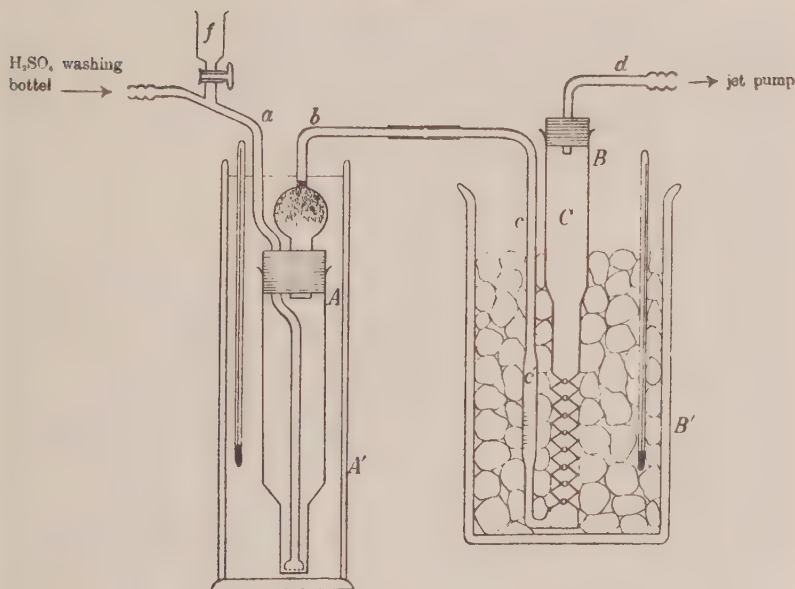
a) Stock: Dissolve 0.1 g of phenol red in 5.7 cc *M*/20 NaOH in a 100 cc. volumetric flask and add water to the mark.

b) Standard. Pipette 0.3 cc. of the stock solution into 10 cc. of a buffer mixture at pH 7.93 consisting of 5.5 cc. borate solution and 4.5 cc. of 0.1 n. HCl and finally add 10 cc. of CO₂-free distilled water. Borate solution is prepared by dissolving 12.404 gm. H₃BO₃ in 100 cc. 1 n. NaOH and diluting up to 1 liter according to Walbum. The colour of this standard set at 8.2 mm. in the colorimeter has the same depth as that developed in the test by 0.1 mg. menthol and set at 10 mm.

APPARATUS.

1. Distillation vessel *A*: It is composed of two parts. The upper wide part is 17 cm. × 3 cm. and the lower 6 cm. × 1.7 cm. *A* is provided with a two-hole rubber stopper, one of which is fitted with an inlet tube *a* and the other with a delivery tube *b*. *a* has about ten small holes at the lower end. The bulb of *b* is filled with cotton wool.
2. Condenser *B*: It is composed of a main tube *C* and a narrow inlet tube *c*. The upper part of *C* is 14 cm. ×

Fig. 1.



2.2 cm. and the middle 4 cm. \times 1.7 cm. The lower part is 6.5 cm. \times 1.7 cm. and has many depressions so as to facilitate the condensation by enlarging the surface.

The smallest inner diameter of it measures about 0.3 cm.

c communicates with the bottom of *C* through many small holes (about 10) perforated in a septum. The

inner diameter of the swollen part (*c'*) of *c* is 0.85 cm.

and is graduated at 4.5, 4.7, 4.9, 5.0, 5.5, 5.7, 5.9 and 6.0 cc. *b* and *c* is connected closely by a rubber tubing.

C is provided with a rubber stopper fitted with tube *d*, which is connected with a jet pump.

3. a H₂SO₄ washing bottle.

PROCEDURE.

Free menthol.

Tissue: Add 1 cc. water to 1 gm. tissue pulp, mix thoroughly and then deproteinize by addition of absolute alcohol up to 6 cc.

shake and filter. Pipette 3 cc. of the filtrate into the distillation vessel, and half a tea-spoonful anhydrous sodium sulfate and let stand in the cylinder *A'* after careful shaking. Connect *A*, after a while, with *B*, which has been cooled in advance in the freezing mixture of temperature at about -10°C . Next connect *B* with the jet pump and finally *A* with the H_2SO_4 washing bottle. Suck slowly and pour into the cylinder *A'* water which has been heated to about 70°C . It is to be filled high enough to immerse the whole bulb of *b*, and the temperature is to be kept between 70° and 50°C throughout the whole run. Continue the gentle aspiration for five minutes, during which nearly all the liquid is carried over into *B*. Thereupon suck rapidly. At the end of 15 and 20 minutes after the suction was commenced pour each time 1 cc. of absolute alcohol, through *f* into *A* and at the end of 30 minutes disconnect the apparatus from the pump. Take out *B* and warm it to the room temperature. The volume of the distillate is to be noted. The colour reaction is now to be carried out with this distillate.

Pipette 1 cc. into a large test tube (20 cm. \times 3 cm.), add 5 cc. of the dimethylaminobenzaldehyde reagent to it, and place the tube in a boiling bath after closing with a cork stopper holding a calcium chloride tube. After the lapse of two minutes, cool under running water. Compare the pinkish red colour developed with the artificial standard, usually set at 8.2 mm., within 30 minutes.

Blood: Take 1 cc. blood with 1 cc. of water and then de-proteinize it by the addition of absolute alcohol up to 8 cc. In this case submit 4 cc. of the filtrate to distillation instead of 3 cc., the total volume of the distillate thus amounting nearly to 6 cc.

CALCULATION.

Let the reading of unknown be *X*, and the volume of the distillate *y*, then the amount can be calculated from the equation.

$$\frac{\text{Reading of artificial standard} \times \frac{10}{8.2}}{X} \times \frac{y}{5} \times 0.1 \times 1000$$

is number of mg of free menthol in 100 gm. of tissue or in 100 cc.

of blood. When the content in 0.1 g. tissue or in $0.1 \times \frac{5}{6}$ cc. blood, which corresponds to about 1 cc. of the distillate, is less than 0.05 mg., use a standard menthol solution of nearly equal dilution because the reagent alone becomes tinged yellowish by heating and its influence upon the colorimetric reading can not be neglected.

Conjugated menthol.

Transfer the definite amount of the filtrate from tissue or blood filtrate (3 and 4 cc. respectively) into a beaker having a capacity of 50 cc. and evaporate gently on the lid of a boiling bath, and take the beaker off the bath as soon as the content is dried and smells no more of menthol—avoid too long heating, or the brownish substances produced will not be absorbed perfectly by $\text{Cd}(\text{OH})_2$ and interfere with the colour development of menthol. After cooling, dissolve the residue in 3 cc. of 0.1 n NaOH solution by scratching the lipoids off the inside of the container, and 1 cc. of cadmium sulfate solution, under shaking, and then 1 cc. of water. Filter. The filtrate should be clear and colourless as water. Treat 1 cc. filtrate¹⁾ with dimethylaminobenzaldehyde and compare the colour as described. The equation for calculating free menthol can be applied to this case if the factor $\frac{Y}{5}$ is omitted.

NOTES.

1. The depth of colour developed by menthol differs, neither by using variously concentrated dimethylaminobenzaldehyde solution (0.5 to 5%), nor by applying menthol in different mixtures of alcohol with water, but is affected markedly by the dilution of sulfuric acid as solvent of the aldehyde. 1 part of water is to be mixed with more than 1.5 parts (1.5 p.–1.75 p. were tested) of the acid. In these concentrations of sulfuric acid the colour intensity

1) When the tissue or blood contains an enormous quantity of free menthol and is rich in fat, the filtrate should be previously made slightly alkaline with a measured quantity of 0.1 n. NaOH and extracted with 10 cc. ether twice. The calculation is to be modified correspondingly. But such a case is met with only in special experiments.

is constant, but when diluted more, it becomes less intensive.

2. Menthol conjugates in the animal body mostly with glucuronic acid. Therefore the author prepared variously concentrated solutions of mentholglucuronic acid in water by treating with equivalent amounts of sodium hydroxide and tested on the colour development. Its depth matched exactly that of alcoholic menthol solution of corresponding content.

3. Duration of heating changes the colour nuance to some extent; the pinkish red colour becomes brownish red on longer heating (for 5 min.), although its intensity is influenced slightly.

4. The depth of colour corresponds exactly to the amount of menthol within the limits from 0.05 mg. to 0.5 mg.

5. Colour comparison is to be made within 30 min. after heating. On standing longer, the colour changes brownish and fades gradually.

6. In the analysis of conjugated menthol, evaporation and the treatment with $\text{Cd}(\text{OH})_2$ removes all the free menthol except in the case mentioned in the footnote p. 281 and in that of free menthol, no menthol glucuronic acid is carried over into the distillate.

7. The non-protein filtrate contains substances which gives colour reaction(brown) with the reagent of this method, but are removed by $\text{Cd}(\text{OH})_2$ and are not volatile.

8. So small an amount as 0.005 mg. menthol can be detected by this method.

9. An example of analysis will be given:

A male rabbit weighing 1840 gm. was injected subcutaneously with menthol glucuronic acid (dissolved in water, and in quantity of 1 gm. per kg. of body weight) and killed after 1 hour by bleeding.

	taken for analysis	Cd-filtrate, taken for colour reaction	Conjugated menthol
blood	1 cc.	1 cc. (corresponding to 0.1 cc. blood)	21.7 mg per 100 cc.
kidneys(11.5 gm)	1 gm	„ (corresponding to 0.1 gm tissue)	185,2 mg per 100 gm
liver(26 gm)	„	„ („)	±
lungs(8 gm)	„	„ („)	trace
skeletal muscle	„	„ („)	—

SUMMARY.

A micromethod of determination of menthol free and conjugated in tissue and blood was noted. A practical example was also given.

I wish to express my sincere gratitude to Professor K. Kodama for his interest and kind revision.

STUDIES ON THE STICK ANTIMONY ELECTRODE.

I. The degree of stability of electrode potential and its effect on the relation between pH and E.M.F.

By

TETUO TOMIYAMA.

(*From the Imperial Fisheries Institute, Tokyo.*)

(Received for publication, June 28, 1933)

It will make a great contribution to the biochemical study of the media for aquatic organisms when we can measure continuously its changing pH without taking any samples on purpose. The antimony electrode has been frequently used for such a self-recording design in the industrial line, but the existing results cannot be expected to be accurate.

Up to the present time, much study has been made of the antimony electrode, especially of the stick type one; Kolthoff and Hartong 1925; Vlès and Vellinger 1927; Franke and Willaman 1928; Snyder 1928; Itano 1929, 1930; Galvez 1930; Parks and Beard 1932; Uemura and Sueda 1933 are the chief investigators. But the results obtained by the different authors do not agree well, and as will be stated later in more detail, this lack of concordant results may be explained by the differences in the procedures used. Kolthoff and Hartong, Britton and Robinson (1931) determined the electrode potential in the solution to which some antimony trioxide had been added. Franke and Willaman, Snyder, Itano, Britton and Robinson, on one hand, adopted the method of measuring potential while the sample solution was moved by a stirrer or bubbling, or by shaking the sealed electrode vessel. On the other hand, Parks and Beard, Uemura and Sueda studied the relation between pH and E.M.F. with the electrode in unstirred solution in contact with air. The empirical formulae which have been derived by numerous investigators are very divergent and generally do not fit the Nernst

formula, as is seen from the following comparison.

Kolthoff and Hartong

$$E = 0.0415 + 0.0485 \text{ pH (pH 1-5 at } 14^\circ)$$

$$E = 0.009 + 0.0536 \text{ pH (above pH 8 at } 14^\circ)$$

Lava and Hemedes

$$E = 0.052 + 0.057 \text{ pH}$$

Franke and Williaman

$$E = 0.050 + 0.054 \text{ pH at } 25^\circ$$

Harrison and Vridhachlam

$$E = 0.0234 + 0.0498 \text{ pH at } 30^\circ$$

Itano

$$E = 0.017 + 0.054 \text{ pH at } 18^\circ$$

Britton and Robinson

$$E = 0.018 + 0.0534 \text{ pH}$$

Parks and Beard $E = 0.030 + 0.05915 \text{ pH at } 25^\circ$

Uemura and Sueda

$$E = -0.0007 + 0.0538 \text{ pH}$$

The writer

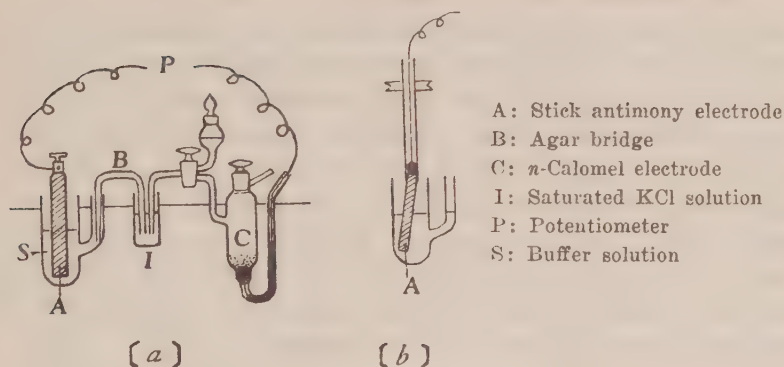
$$E = 0.022 + 0.0567 \text{ pH at } 20^\circ$$

For the purpose of applying this electrode to a biochemical work that requires fair accuracy, the present author has investigated systematically some factors governing the electrode potential, using the stick type electrode which has advantages over several other types in being sturdy and easy to prepare. This paper deals with the difference of potential between a stationary and a shaking state of the electrode, the degree of stability of potential in the stationary state at different temperatures, and the effect of these variables upon pH-E.M.F. curve. From the data obtained, some explanations and criticism also have been made of the divergency of the results obtained by different workers.

EXPERIMENTAL METHOD.

For the present investigation, the set of apparatus illustrated in Fig. 1, a was used and the potential difference between antimony electrode and *n*-calomel electrode was measured by a portable PPP-potentiometer (Shimadzu Co.), connected with the needle galvanometer, having a sensibility 10^{-8} . Therefore, the accuracy of the

Fig 1.



present investigation would be in the neighbourhood of ± 0.5 mv. All these measurements were carried out, immersing both electrodes in a thermostat.

Preparation of Stick Antimony Electrode and its Preliminary Treatment.

In a part of the experiment, the stick antimony electrode sold by Shimadzu Co. was used; but as the mode of its preparation was somewhat ambiguous, the author prepared several electrodes which had a difference in cooling rate of the Merck's antimony molten in a pyrexglass tubing as indicated in Table I.

TABLE I.

Notation of electrode	Mode of preparation
F 1	Metallic antimony fused in an electric furnace is poured in a glass tube and then left to cool gradually at room temperature.
F 2	After casting in the same manner as mentioned above, this is cooled very gradually from fused point to room temperature leaving it in an electric furnace.
D 2	The metal with which the glass tube is previously filled is fused by holding it horizontally on a Bunzen burner, then left to cool at room temperature.
F S	The antimony fused in the same way as F 1 is suddenly cooled by dipping in cold distilled water.

The electrodes were polished with fine emery cloth; then, in order to cover the surface of electrode with a compact film of antimonous oxide, they were submitted to preliminary treatment by being left immersed in the buffer solution of pH 11.8 at room temperature for 2 or 3 days. Since the electrode surface freshly polished shows a different color when immersed either in acidic or in alkaline solution as was noticed by Uemura and Sueda, and since it loses its metallic property if used continuously for some time, the preliminary treatment is to be adhered to always as above and it should be used without polishing to render the surface condition always the same as far as possible.

Buffer Solution.

Instead of using a series of separate buffer solutions for calibrating the electrodes, the Prideaux-Ward universal buffer mixture, containing the same kinds of acid throughout the range, was adopted and the pH's of all buffer solutions were accurately checked up with both hydrogen electrode (pH 7-12) and quinhydrone electrode (pH 2-8).

EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION.

Experiment 1.

Difference of Electrode Potential Between a Stationary and a Shaking State of the Electrode.

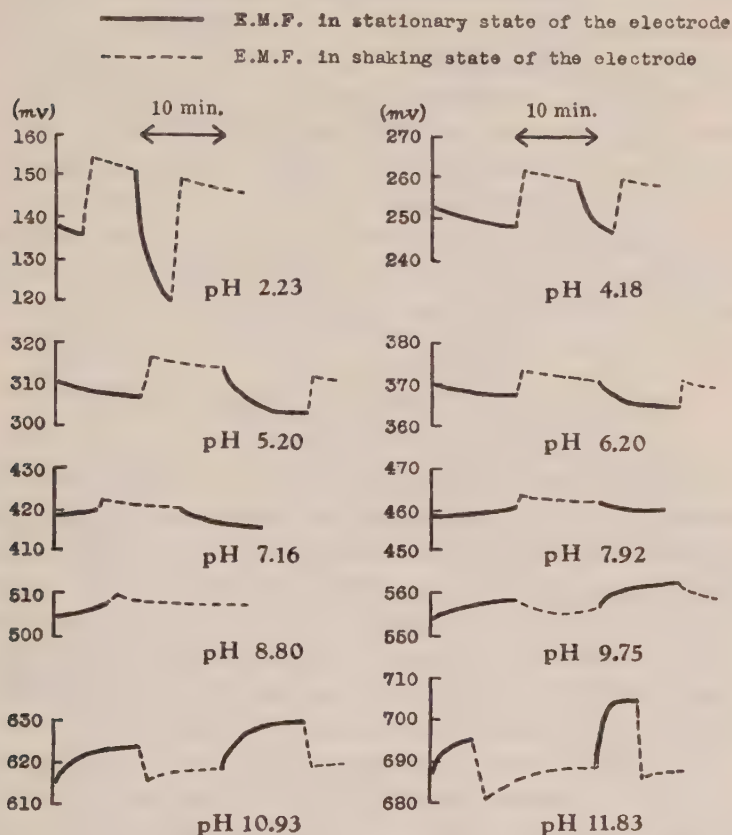
Harrison and Vridhachlam (1929), Snyder, and Itano (1930) pointed out that the potential in a stationary state showed higher values than that in a shaking state of the electrode.

In order to examine these effects in detail at different pH's, the change of electrode potential was measured during the intermittent rotation of the electrode (sold by Shimadzu Co.) which was cemented to a glass tube in an eccentric position (Fig. 1, b), and the results thus obtained were illustrated in Fig. 2, the rate of rotation in this case amounting to about 100 revolutions per minute.

Fig. 2 shows that the direction of change of potential with the

Fig. 2.

Change of potential against *n*-calomel electrode in stationary state and shaking state of the electrode.



passage of time is opposite according to whether pH of buffer solution is smaller or greater than pH 7-8. When pH is smaller than 7-8, the absolute value of potential difference between antimony electrode and *n*-calomel electrode decreases gradually; that is, the positive electric charge of the electrode tends to increase. On the contrary, if pH is greater than 7-8 the above changes are quite the reverse, and the more remote the pH of solution from 7-8 the more these changes are enhanced.

It will be seen also that if the electrode is transferred from a

stationary to a shaking condition, a sudden remarkable change in the electrode potential arises particularly in region of pH far remote from pH 7-8. And in the acidic region, the trend of this change is the increasing direction of absolute potential difference, that is, the decrease in positive charge, while in alkaline condition this relation is opposite. From this experiment, it is confirmed that the slope of pH-E.M.F. curve in a stirred condition will become smaller than that in an unstirred condition when we take the initial value of potential instead of true equilibrated value. Further, since the rate of change in electrode potential is nearly the same, whether in stirred or in unstirred solution, there is perhaps no relative superiority in accuracy between these two conditions.

Experiment 2.

The Effect of Temperature upon the Change in Electrode Potential.

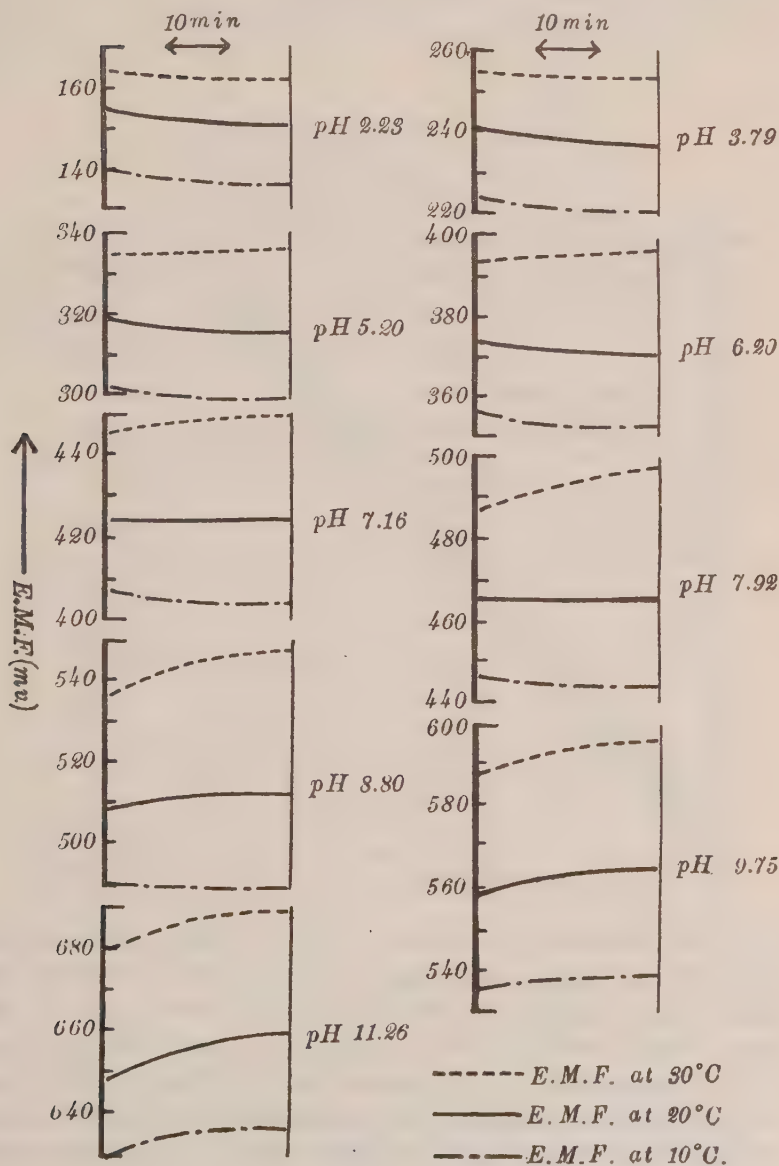
It has been noted recently by Uemura and Sueda that the directions of change in potential are dependent upon the pH value of solution, and that the time interval to arrive at equilibrium depends also on the pH value, namely, at about pH 8 it takes a much shorter time to reach equilibrium than at pH far remote from 8. Similar results were obtained, but the equilibrium was never reached in 20-30 minutes in the present experiment. It might be due partly to the different treatment of the electrode.

So far as the writer knows, there is no detailed investigation as to the effect of temperature on the potential, so that the E.M.F.'s. of antimony electrode against *n*-calomed electrode at 10.0°, 20.0° and 30.0°C. were measured during 30 minutes after immersing FS electrode in the buffer solutions. The results obtained are given in Fig. 3.

There is relatively little change in potential at the pH value smaller than 8, whereas on the opposite region of pH, much greater change takes place for 30 minutes. And increase or decrease in potential until equilibrium is established is not only dependent on pH, but is influenced largely by temperature. From these data, the pH-E.M.F. curves at different temperatures were obtained as

Fig. 3.

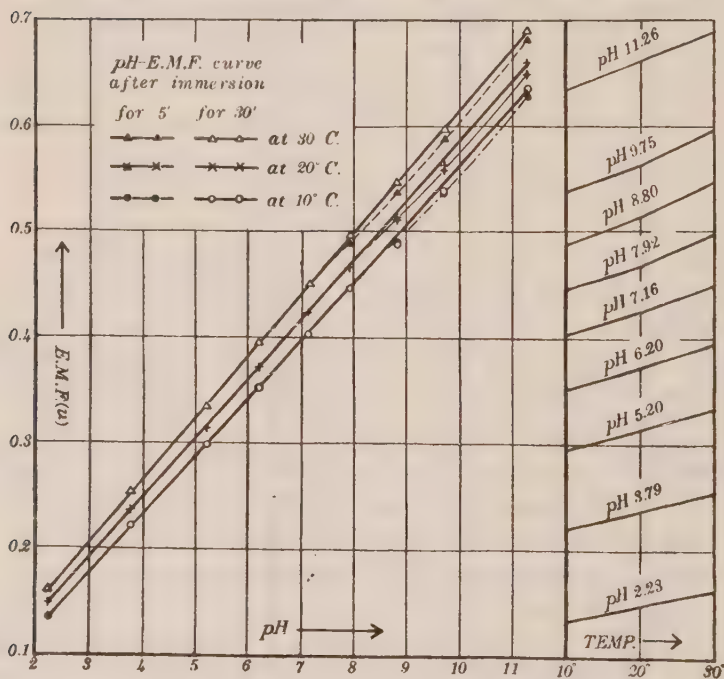
The effect of temperature on the change in E.M.F. of antimony electrode against *n*-calomel electrode.



seen in Fig. 4, and thus the following temperature coefficients of the electrode were ascertained.

pH of solution	Change in potential in mv. per 1° C.
2-4	1.5
5-7	2.0
8-11	2.5-3.0

Fig. 4.
pH-E.M.F. curves at different temperatures.



Upon examining the curves of Fig. 4 it will be noticed that if the values observed at a shorter period after immersing the electrode are adopted, marked concave-curve results at the pH greater than 8, and this curve approaches to nearly a straight line at high temperature. In the papers both of Parks and Beard and of Uemura and Sueda, appreciable deviation from the straight line in alkaline side is clearly observed and consequently

it seems to be rather reasonable that the experimental formulae calculated from their results do not coincide with theoretical Nernst formula. For this reason the behaviours of this electrode in different pH's were reexamined for a much longer period in the next experiment.

Experiment 3.

The Effect of Time-Period of Immersion on pH-E.M.F. Curve.

The electrodes (F1, F2, D2.) were immersed in the buffer solution at 20°C. and during 150 minutes the change in potential was measured. In no case was complete equilibrium of potential practically established as is shown in Fig. 5.

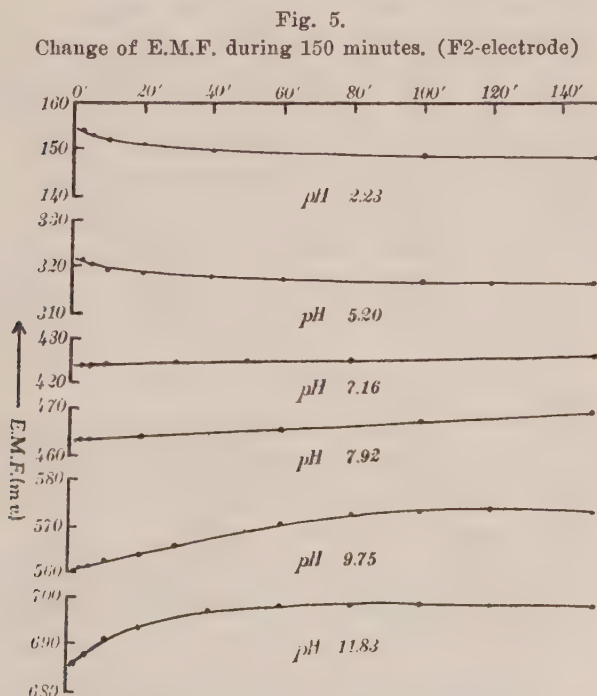


Fig. 5 indicates that the change in potential in the region of pH above 9.7 is rapid and great i.e. 10–15 mv. per 100 min., while

TABLE II.

No. of electrode Exp. formula	E.M.F. at 5 min. after immersion				E.M.F. when the change of it attains to 1 mv. per 30 min.				E.M.F. at 150 min. after immersion			
	F 2	D 2	F 1		F 2	D 2	F 1		F 2	D 2	F 1	
	E=0.030 + 0.0551pH	E=0.030 + 0.0549pH	E=0.032 + 0.0550pH		E=0.023 + 0.0566pH	E=0.021 + 0.0567pH	E=0.022 + 0.0569pH		E=0.020 + 0.0569pH	E=0.018 + 0.0570pH	E=0.020 + 0.0572pH	
E.M.F.	cal. obs. Δ	cal. obs. Δ	cal. obs. Δ		cal. obs. Δ	cal. obs. Δ	cal. obs. Δ		cal. obs. Δ	cal. obs. Δ	cal. obs. Δ	
pH												
2.23	153 152 -1	152 151 -1	154 154 0		149 150 +1	147 150 +3	149 152 +3		147 148 +1	145 148 +3	148 149 +1	
3.79	239 241 +2	238 241 +3	240 241 +1		237 239 +2	236 239 +3	238 239 +1		236 237 +1	234 236 +2	237 238 +1	
5.20	317 320 +3	316 323 -3	318 320 +2		317 318 +1	316 315 -1	318 318 0		316 315 -1	314 314 0	317 317 0	
6.20	372 375 +3	370 374 +4	373 377 +4		374 372 -2	373 370 -3	375 373 -2		373 371 -2	371 368 -3	375 371 -4	
7.16	425 424 -1	423 423 0	426 426 0		428 425 -3	427 423 -4	429 427 -2		427 426 -1	426 426 0	430 430 0	
7.92	467 464 -3	465 462 -3			471 469 -2	470 470 0			471 470 -1	469 470 +1		
8.80	515 511 -4	513 510 -3	516 511 -5		521 518 -3	520 518 -2	523 522 -1		521 518 -3	520 519 -1	523 523 0	
9.75	567 561 -6	565 560 -5	568 560 -8		574 572 -2	574 570 -4	577 573 -4		575 572 -3	574 572 -2	578 573 -5	
11.26	650 652 +2	648 648 0	651 652 +1		660 660 0	659 657 -2	663 660 -3		661 660 -1	660 658 -2	664 660 -4	
11.83	682 689 +7	680 688 +8	683 690 +7		693 698 +5	692 700 +8	696 705 +9		693 698 +5	692 698 +6	697 705 +8	

in the region of pH below 7.0 this is very small and gradual, i.e. 3–5 mv. per 100 min. and that in the former case the time to reach nearly equilibrium is within 100 min., whereas in the latter case about 1 mv. per 30 min. continues to change for 2.5 hours. Thus the potential does not readily attain its complete equilibrium value, and so it follows that various experimental formulae can be obtained corresponding to the values at different time intervals. These relations are summarised in Table II.

It is highly probable, therefore, that the reason why former investigators have obtained experimental formulae quite different from one another is due to the different conditions under which the measurement was carried out. In consequence, from these experimental data, the author adopted provisionally the values when slope of change dv/dt attained to $1/30$, namely change of 1 mv. per 30 min., and from these values (F2 electrode) the pH-E.M.F. curve was obtained as shown in Fig. 6.

In this case there exists nearly a linear relationship between pH and E.M.F., but in the case where E.M.F.'s. after five minutes' immersion are employed, this deviates from the linear. As an average of three experimental formulae which were calculated from the nearly equilibrated values by the principle of least square, the following experimental formula was obtained;

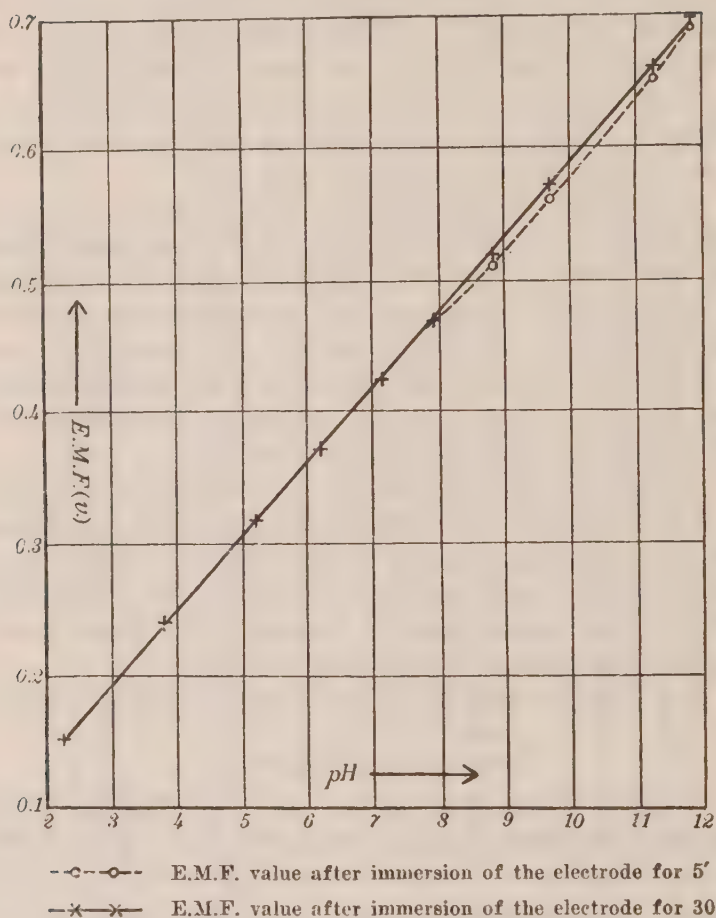
$$E = 0.022 + 0.0567 \text{ pH at } 20^{\circ}\text{C. against } n\text{-calomel electrode.}$$

THEORETICAL CONSIDERATION.

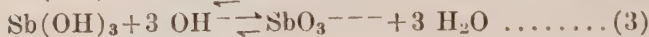
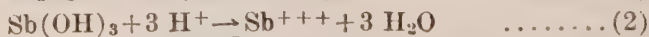
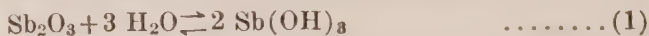
It has been considered in the former investigations that the potential of antimony electrode is determined purely by hydrogen ion concentration whether it is immersed in acidic or in alkaline solution. This is theoretically true, but on observing minutely the change in potential and the behaviour of electrode in different pH's, the following consideration, based on the results of the above experiment, may be accepted so as to interpret the nature of the electrode and the mode of creation of potential.

Since the antimonous oxide which is formed on the metal electrode has an amphoteric nature, it behaves as acid or base according to the pH of the solution in which the electrode is im-

Fig. 6.
pH-E.M.F. curve when the change of potential
attains 1 mv. per 30 minutes.



mersed, as will be seen in the following equation.



In the acidic side of the isoelectric point, antimonous oxide gives off electrons to the hydron in accordance with equation (2)

forming antimony ion and water molecule and consequently positive charge at the electrode increases so far as there exists more hydron. In the alkaline side, on the contrary, reaction between the oxide and hydroxylion takes place according to equation (3), thus increasing negative charge at the electrode.

By the above consideration, the direction of change of potential with the passage of time is clearly explained. Now immerse the electrode in acidic solution, and reaction of equation (2) will proceed until it reaches equilibrium, increasing in this way positive charge at the electrode, so that the potential difference between the electrode and the *n*-calomel electrode which is more positive than the former, decreases gradually as is seen in Fig. 2 (pH 2.2–7.1). In the case of shaking electrode in acidic side, the surface of electrode immediately after shaking will come into contact with a new phase which does not yet contain sufficient amount of Sb^{+++} for equilibrium, and for this reason the electrode potential moves back to its initial value. And next, with the progress of the solution of the oxide, the potential shifts to positive side, namely it comes to decrease the potential difference against the *n*-calomel electrode (Fig. 2). On the other hand, if the electrode is immersed in the solution of alkaline side of the isoelectric point, the electrode acts as acid; and quite contrary to the behaviour of acidic side, its potential moves to negative side, thus increasing the potential difference against the *n*-calomel electrode. This consideration agrees well with the results given in Exp. 2 and Exp. 3. It will probably be concluded from Exp. 2, Fig. 3 that the isoelectric point of antimonous oxide would be appreciably influenced by temperature; and at 20°C. this point is determined to be in the neighbourhood of pH 7–8.

As is considered above in detail, the amphoteric nature of the oxide certainly plays a fundamental rôle in the creation of potential, and it is concluded that the change in potential as shown by experiments cannot be avoided by any possible improvement so far as such amphoteric nature is concerned and also that to obtain reproducible results it may be essential to cover the electrode by a stable modification of the oxide.

SUMMARY.

1. Factors governing the potential of stick antimony electrode such as shaking the electrode, temperature, time of immersion, and their bearing on pH-E.M.F. curve have been studied.

2. The electrode which had been coated with antimonous oxide by treating with buffer solution of pH 11.8, showed slight change in its potential if immersed in acidic solution, while a fairly remarkable change was observed in alkaline solution. Although these changes became smaller and smaller as time elapsed, no complete equilibrium was attained during 150 minutes in any case.

3. When the electrode immersed in unstirred solution is shaken suddenly, change in potential against *n*-calomel electrode takes place in such a way as to increase in acidic solution and to decrease in alkaline solution.

4. In unstirred condition, the experimental formula varies, depending on such factors as temperature and time of immersion. The longer it is immersed in solution, the nearer the pH-E.M.F. curve comes to the linear line. If the E.M.F. after five minutes' immersion is taken, this curve comes to deviate from the linear especially in alkaline side. These anomalous behaviours can be explained by assuming that the potential is created by reaction of the amphoteric oxide with either hydrion or hydroxylion.

5. Temperature coefficient of electrode potential varies according to the range of pH and also according to the time interval of immersion in solution. At 30 minutes after immersion, the following values were ascertained between 10°C. and 30°C.

pH of solution	Change in potential difference per 1°C.
2-4	1.5 mv.
5-7	2.0 mv.
8-11	2.5-3.0 mv.

6. By adopting the values of potential when the change attains to 1 mv. per 30 minutes instead of true equilibrated ones, the following experimental formula was obtained in the present investigation.

$E = 0.022 + 0.0567 \text{ pH}$ at 20° , against *n*-calomel electrode.

In conclusion, the author desires to acknowledge his indebtedness to Prof. K. Kawamura and S. Mukai of the Kyushu Imperial University for their kindness in reading the original manuscript and for their very helpful criticism.

REFERENCES.

- Britton and Robinson, (1931): *J. chem. soc.*, **458**.
Franke and Willaman, (1928): *Ind. eng. chem.*, **20**, 87.
Galvez, (1930): *Philippine Agr.*, **19**, 219.
Harrison and Vridhachlam, (1929): *Memoirs Dept. Agr. India*, **10**, 157.
Itano, (1929): *Ber. Ohara Inst. landw. Forsch. Japan*, **4**, 273.
Itano and Arakawa, (1930): *ibid.*, **4**, 383.
Kolthoff and Hartong, (1925): *Rec. trav. chim.*, **44**, 113.
Lava and Hemedes, (1928): *Philippine Agr.*, **17**, 337.
Parks and Beard, (1932): *J. amer. chem. soc.*, **54**, 856.
Snyder, (1928): *Soil science*, **26**, 107.
Uemura and Sueda, (1933): *Bull. chem. soc. Japan*, **8**, 1.
Vlès and Vellinger, (1927): *Arch. phys. biol.*, **6**, 38.

SOME NOTES ON THE CALOMEL ELECTRODE.

By

KENTARO NOMURA.

*(From the Institute of Physiology, Kumamoto Medical College, Japan,
Director: Prof. S. Kodama.)*

(Received for publication, July 3, 1933)

I. ON THE CONSTANCY OF THE CALOMEL ELECTRODE POTENTIAL.

There seemed to be no question about the constancy of the calomel electrode potential after its fresh preparation. Recently Hiraki (1932) raised a doubt about it and experimented on daily variations of the calomel electrode potential after a fresh preparation and came to the conclusion that the calomel electrode does not attain a constant potential for at least two weeks. He proposed to check the potential of a newly prepared calomel electrode always with an old one. This is quite contradictory to a generally accepted belief (Sörensen and Linderström-Lang, 1924) that the old calomel electrode should be calibrated with one freshly prepared. It may be quite necessary to reexamine the experiment of Hiraki before adopting his proposal.

1. Method.

3.5 n. KCl-calomel electrode was selected for the experiment, as it was usually employed in our laboratory as a working electrode, and furthermore it should be preferable to that of a saturated one (Hiraki, 1932).

Four kinds of electrode were made of the same material, except the 3.5 n KCl-solution. The first kind was prepared 27 days before the actual experiment with a 3.5 n. KCl-solution, which had been saturated sufficiently with calomel. The latter was used also for the same electrode. The second was the same as the first but was prepared just before commencing the experiment. The third was prepared with a 3.5 n. KCl-solution, which, being saturated

with calomel, had been kept for 25 days. The calomel was also used for the electrode.

The fourth was prepared with a 3.5 n. KCl-solution, which had not been previously treated with calomel.

Taking the first as a standard half cell, potentials of the others were measured in the water bath of 38°. 3.5 n. KCl-solution was used for the junction liquid.

2. Results.

Results are shown in table I and figure 1.

TABLE I.

Date	E (Volt)	Date	E (Volt)	Date	E (Volt)
27, IX. 1932	0.00056	2, X. 1932	0.00010	27, IX. 1932	0.00195
28, "	0.00042	3, "	-0.00003	28, "	0.00121
29, "	0.00005	4, "	0.00001	29, "	0.00123
30, "	0.00012	5, "	0.00021	30, "	0.00075
1, X. 1932	0.00027	6, "	0.00013	1, X. 1932	0.00057
2, "	0.00021	7, "	0.00016	2, "	0.00020
3, "	0.00032	8, "	0.00020	3, "	0.00025
4, "	0.00029	9, "	—	4, "	0.00027
5, "	0.00024	10, "	0.00001	5, "	0.00026
6, "	0.00030	11, "	-0.00010	6, "	0.00024
7, "	—	12, "	—	7, "	0.00027
8, "	—	13, "	0.00002	8, "	0.00028
9, "	0.00032	14, "	0.00020	9, "	0.00025
10, "	0.00020	15, "	0.00005	10, "	0.00023
11, "	0.00030	16, "	—	11, "	0.00025
12, "	—	17, "	—	12, "	0.00026
13, "	0.00026	18, "	-0.00007		
14, "	0.00029	19, "	-0.00001		
15, "	0.00022	20, "	0		
16, "	—				
17, "	—				
18, "	0.00025				
19, "	0.00025				

Against an old calomel electrode (the first kind) which accord-

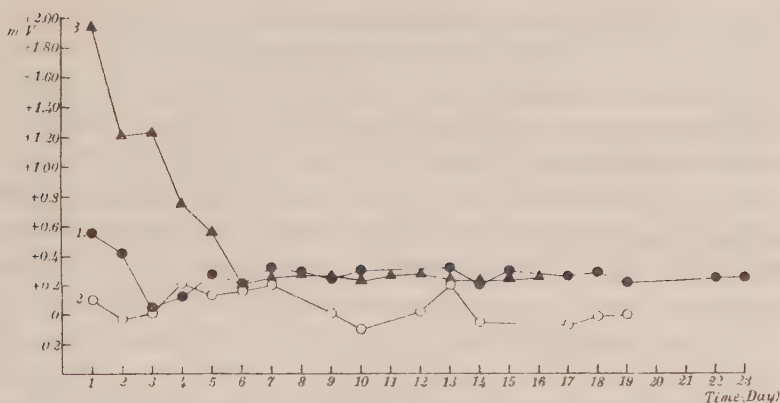


Fig. 1. Dependence of the electrode potential on the lapse of days.

1. Second kind.
2. Third kind.
3. Fourth kind.

ing to Hiraki had to be regarded as having already attained a constant single electrode potential, the second and the third showed in a few days a constant potential difference of not more than 0.0002 volts. Even within these few days the differences were not more than 0.0003 volts; whereas the fourth kind of electrode showed a relatively large potential difference of more than 0.0018 volts, on the first day, which became gradually smaller, and it attained an almost constant value after the 6th day. Potential variations in this case seemed to be similar to those found by Hiraki, though the time required for attaining a constancy was shorter in our case.

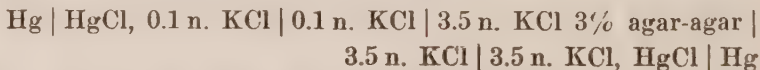
Coggeshall (1895), showed that a normal calomel electrode attained a constant potential in 30 hours, at the latest in 2 days after fresh preparation, if shaking of the calomel in the electrode was avoided. We took no special care not to shake the calomel in the electrode, and still it was not necessary to wait so long a time for getting a constant potential of the 3.5 n. calomel electrode, if the KCl-solution and the calomel was prepared as stated above. This previous treatment is in common use (Clark, 1925; Michaelis, 1921) and may not need any particular mention.

II. EFFECT OF THE TEMPERATURE ON THE 3.5 n. KCl-CALOMEL ELECTRODE.

Effects of the temperature on the 0.1 n. KCl-calomel electrode (Sørensen and Linderström-Lang, 1925; Katsu, 1927) and on the saturated one (Michaelis, 1921; Riehm, 1932,) were thoroughly investigated, and we can deduce any necessary single electrode potential at any temperature within a biologically necessary range. On the 3.5 n. KCl-calomel electrode, few available data were known to us. Sørensen and Linderström-Lang, (1924) have given additional data for 3.5 n. KCl-calomel electrode between 15° and 30°, which should be added to a potential difference between the 3.5 n. KCl-calomel electrode and any other cell, if the potential should be substituted by 0.1 n. KCl-calomel electrode. We wanted to have further data within wider temperature range, especially in the neighborhood of 38°. For that purpose the 0.1 n. KCl-calomel electrode was used as a standard half cell, the single electrode potential π_0 of Sørensen, within wider temperature range, being known to us.

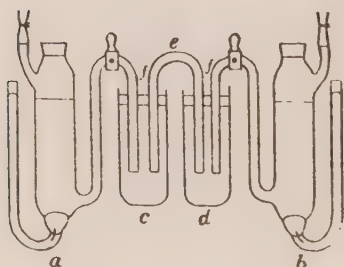
1. Method.

The electromotive force of the following cell was measured at various temperatures between 13° and 43°.



On calculating a single electrode potential of the 3.5 n. KCl-calomel electrode $\pi_{3.5}$ which corresponds to π_0 of the 0.1 n. KCl-calomel electrode, that is, potential difference between the normal

Fig. 2.



- a: 0.1 n. calomel electrode
- b: 3.5 n. calomel electrode
- c: 0.1 n. KCl solution
- d: 3.5 n. KCl solution
- e: 3.5 n. KCl Agar-agar-bridge
- f: Paraffin layer

hydrogen electrode with 1 atmospheric pressure of dry hydrogen, and the 0.1 n. calomel electrode, values of π_0 found by Katsu (1927) were used as more theoretically correct.

The 0.1 n. KCl- and 3.5 n. KCl-solution as connecting fluids were covered with thin layers of liquid Paraffin to be protected against evaporation.

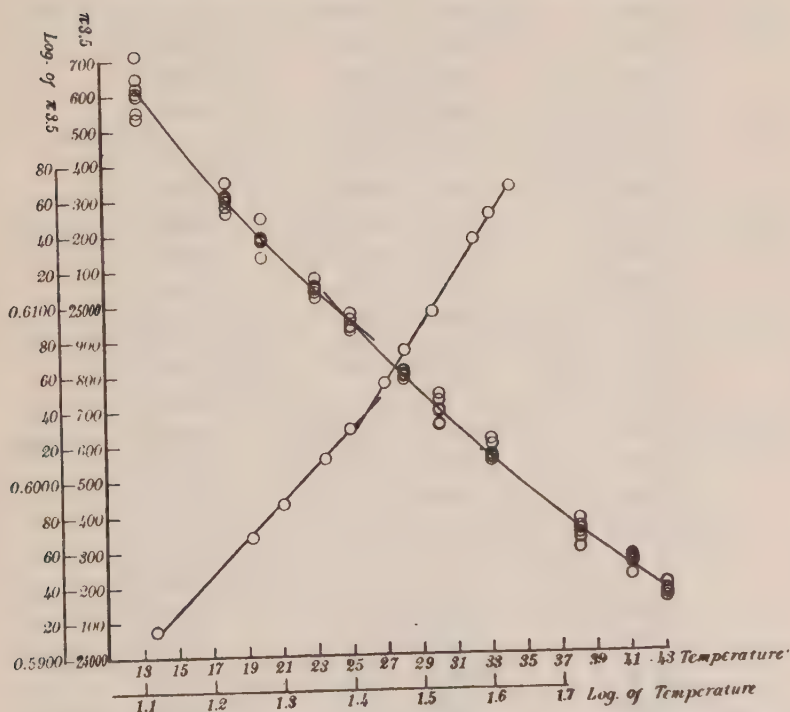
We waited about one hour before commencing an actual measurement according to Hiraki to attain an equilibrated potential at the temperature.

2. Results.

Results were shown in table II and figure 3.

Fig. 3.

Effect of temperature on the 3.5 n. KCl-calomel electrode.



Diffusion potentials were neglected here. These values lie

TABLE II.

Temp. (°C)	Date	E (Volt)	E (Mean)	$\pi_{3.5}$ (Volt)	$\pi_{3.5}$ (Mean)
13	28, IV. 1933	0.08010	0.08007	0.25610	0.25613
	3, V. "	0.08020		0.25600	
	4, "	0.07970		0.25650	
	5, "	0.08082		0.25538	
	6, "	0.08067		0.25553	
	7, "	0.07905		0.25715	
	8, "	0.07997		0.25623	
18	28, IV. 1933	0.08228	0.08276	0.25352	0.25304
	3, V. "	0.08318		0.25262	
	4, "	0.08298		0.25232	
	5, "	0.08270		0.25310	
	6, "	0.08265		0.25315	
	7, "	0.08280		0.25300	
	8, "	0.08271		0.25309	
20	3, V. 1933	0.08375	0.08368	0.25185	0.25192
	4, "	0.08420		0.25140	
	5, "	0.08310		0.25250	
	6, "	0.08369		0.25191	
	7, "	0.08371		0.25189	
	8, "	0.08363		0.25197	
23	3, V. 1933	0.08476	0.08482	0.25054	0.25048
	4, "	0.08510		0.25020	
	5, "	0.08480		0.25050	
	6, "	0.08453		0.25077	
	7, "	0.08491		0.25039	
	8, "	0.08481		0.25049	
25	3, V. 1933	0.08550	0.08560	0.24960	0.24950
	4, "	0.08583		0.24927	
	5, "	0.08574		0.24936	
	6, "	0.08532		0.24978	
	7, "	0.08571		0.24939	
	8, "	0.08550		0.24960	

28	3, V. 1933	0.08681	0.08681	0.24799	0.24799
	4, "	0.08695		0.24785	
	5, "	0.08680		0.24800	
	6, "	0.08675		0.24805	
	7, "	0.08670		0.24810	
	8, "	0.08683		0.24797	
30	3, V. 1933	0.08761	0.08765	0.24699	0.24695
	4, "	0.08804		0.24656	
	9, "	0.08766		0.24694	
	10, "	0.08734		0.24726	
	11, "	0.08718		0.24742	
	12, "	0.08806		0.24654	
33	9, V. 1933	0.08870	0.08846	0.24550	0.24574
	10, "	0.08822		0.24598	
	11, "	0.08809		0.24611	
	12, "	0.08852		0.24568	
	13, "	0.08860		0.24560	
	15, "	0.08865		0.24555	
38	10, V. 1933	0.09003	0.09018	0.24357	0.24342
	11, "	0.09061		0.24299	
	12, "	0.08980		0.24380	
	13, "	0.09010		0.24350	
	15, "	0.09020		0.24340	
	17, "	0.09035		0.24325	
40	10, V. 1933	0.09054	0.09074	0.24276	0.24256
	11, "	0.09111		0.24219	
	12, "	0.09068		0.24262	
	13, "	0.09061		0.24269	
	15, "	0.09074		0.24256	
	17, "	0.09078		0.24252	
43	10, V. 1933	0.09100	0.09115	0.24190	0.24173
	11, "	0.09129		0.24161	
	12, "	0.09139		0.24151	
	13, "	0.09115		0.24175	
	15, "	0.09121		0.24169	
	17, "	0.09096		0.24194	

approximately on two lines which can be expressed by the two following formulae.

$$\pi_{3.5} = 0.28382t - 0.03988 \quad (13^\circ - 25^\circ)$$

$$\pi_{3.5} = 0.30249t - 0.05967 \quad (25^\circ - 43^\circ)$$

SUMMARY.

1. By comparing the potentials of four kinds of 3.5 n. KCl-calomel electrode, it was found that the potential attained a constant value in a short time, at the latest in 2 days after fresh preparation, if the KCl-solution for the electrode had been thoroughly saturated with HgCl before its preparation.

2. Single electrode potentials of 3.5 n. KCl-calomel electrode ($\pi_{3.5}$) at several temperatures were investigated and the following data were found.

TABLE III.

Temp.	13	18	20	23	25
$\pi_{3.5}$ exp.	0.25613	0.25304	0.25192	0.25043	0.24950
$\pi_{3.5}$ cal.	0.25622	0.25291	0.25183	0.25045	0.25020

Temp.	25	28	30	33	38	40	43
$\pi_{3.5}$ exp.	0.24950	0.24799	0.24595	0.24574	0.24342	0.24256	0.24173
$\pi_{3.5}$ cal.	0.24963	0.24795	0.24693	0.24553	0.24348	0.24273	0.24168

These values lie approximately on two lines expressed by the two following formulae.

$$\pi_{3.5} = 0.28382t - 0.03988 \quad (13^\circ - 25^\circ)$$

$$\pi_{3.5} = 0.30249t - 0.05967 \quad (25^\circ - 43^\circ)$$

REFERENCES.

- Clark, W. M. (1925): The Determination of Hydrogen Ion (Baltimore).
 Coggeshall, G. W. (1895): *Zs. f. Physik. Chem.*, **17**, 62.
 Hiraki, M. (1932): *Act. Schol. Med. Univ. Imp. Kiotoensis*, **14**, 300.
 Katsu, Y. (1927): *J. Biophysics*, **2**, 95.

- Michaelis, L. (1921, i): Die Wasserstoffionenkonzentration (Berlin).
— (1921, ii): Praktikum der physikalischen Chemie (Berlin).
Riehm, H. (1932): Zs. f. Physik. Chem., **160**, 1.
Sørensen, S. P. L. and Linderström-Lang, K. (1924): C. r. Trav.
Labor. Carlsberg, **15**, 6.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER HAMMARSTEN- SCHEN REAKTION DER CHOLSÄURE.

VON

KAZUMI YAMASAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 5. Juli 1933)

Es ist schon allgemein anerkannt, dass die Jodcholsäurereaktion nach Mylius (1887) und die Blaureaktion nach Hammarsten (1909) für die Cholsäure spezifisch¹⁾ sind. Wie die Autoren selbst zugegeben haben, treten diese Reaktionen nur bei der reinen Cholsäure ein und sind nicht so empfindlich, dass sie bei allen cholsäurehaltigen Materialien positiv ausfallen. Nach den Angaben von E. Vahlen (1895) und H. P. T. Örum (1904) soll die Myliussche Reaktion aber auch bei der unreinen Cholsäure positiv ausfallen.

Was die Blaureaktion nach Hammarsten anbetrifft, so wurde bisher weder ihre Spezifität noch ihre Empfindlichkeit näher erörtert, denn die Reaktion nach Hammarsten ist zeitraubend und beansprucht grosse Mengen von Material. Daher habe ich nun diese Reaktion eingehend studiert und gefunden, dass die Reaktion bei Erwärmen einer minimalen Menge von reinem sowie nicht reinem Material mit der rauchenden Salzsäure ziemlich spezifisch positiv für die Cholsäure ausfällt und leicht u. schnell ausgeführt werden kann.

Mit der modifizierten Reaktion ist es mir gelungen, die Anwesenheit der Cholsäure in Cadechol von Ingelheim und in

1) Vor kurzem haben Nakagawa u. Fujikawa (1930) eine „Rote Reaktion“ genannte Reaktion der Gallensäuren angegeben, die von der Herzfeld-Hämmelischen Reaktion für Gallensäuren abgeleitet ist. Diese Reaktion ist mit der reinen Desoxycholsäure u. Anthropodesoxycholsäure, die in Menschen- u. Rindergalle reichlich enthalten sind, negativ ausgefallen. Die Bestimmung der Gallensäure mit Nakagawascher Reaktion ist daher nur in der Galle, die Cholsäure enthält, ausführbar.

Hühnergalle nachzuweisen, in welcher letzterer (von Windaus 1926; Yonemura 1926; und Hoshijima 1931) Chenodesoxycholsäure und Isolithocholsäure gefunden wurden.

Nach Hammarsten (1909) soll seine Reaktion ausser mit Cholsäure noch mit der α -Phocächolsäure (inkl. α -Phocätaurocholsäure) und dem α -Scymnol (inkl. α -Scymnolschwefelsäure) positiv ausfallen. Ich habe mit der modifizierten Methode verschiedene Gallensäuren und ihre Derivate untersucht. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die mit der neuen, bzw. originalen Probe positiv reagierenden Gallensäuren in der Galle sind Cholsäure, α -Phocächolsäure, α -Scymnol und ihre gepaarten Säuren.

Aus der Tabelle kann man ersehen, dass die 3.12-Dioxycholansäure (Desoxycholsäure) keine modifizierte Reaktion zeigt, während die 3.7.12-Trioxycholansäure (Cholsäure) und die 3.12-Dioxycholensäure [Apocholeensäure und Dioxycholensäure Boedecker (1920, 1921)] positive Reaktion ergeben. Aus diesen Daten geht hervor, dass für diese Farbenreaktion der Gallensäure die Anwesenheit einer sekundären Alkoholgruppe oder einer Doppelbindung im Ring B des Gallensäuremoleküls notwendig zu sein scheint. Andererseits zeigen die 3.7-Dioxycholansäure [Cheno- (Windaus, 1924) oder Anthro-Desoxycholsäure (Wiand, 1924)], die 3.6-Dioxycholensäure [Hypo-desoxycholsäure (Windaus (1926))] und die 3.7.23-Trioxycholansäure [β -Phocächolsäure (Windaus, 1928)] keine neue, bzw. originale Farbenreaktion. Auch die 7.12-Dioxycholensäure [Isodesoxycholsäure vom Schmp. 208°C (Borsche, 1926)] ergibt keine neue Reaktion. Daraus ist zu ersehen, dass für die Hammarstensche Reaktion auch die beiden sekundären Alkoholgruppen in Ring A und C unerlässlich zu sein scheinen. Die Notwendigkeit der beiden Alkoholgruppen für die Farbenreaktion kann auch dadurch erklärt werden, dass die verschiedenen Cholatriensäuren [α -Cholatriensäure I u. II. (Shimizu 1932), β -Cholatriensäure (Borsche 1931, Wiand 1931), β -Cholensäure (Borsche 1931; Wiand 1931) und Dehydroapocholsäure (Borsche, 1931)] keine neue Farbenreaktion zeigen. Aus den obigen Ergebnissen kommt man zu der Annahme,

Gallensäuren	Farbenumschlag			Absorptions- band
	am Anfang	nach einiger Zeit	am Ende	
Cholsäure Fp 198°C	gelblich getrübt	purpur→ blauviolett	gelblich getrübt	560–590 mμ
Cholsäureäthylester Fp 160°C	„	„	„	„
Glykocholsäure Fp 152–156°C	„	rötlich→ blauviolett	„	„
Taurocholsäure (weiss)	„	„	„	„
Dehydrocholsäure Fp 239°C	gelblich klar	—	—	—
α-Cholatriensäure I Fp 165°C	weiss getrübt	—	—	—
α-Cholatriensäure II Fp 170°C	„	—	—	—
β-Cholatriensäure Fp 133°C	„	—	—	—
Apocholeinsäure Fp 174°C	gelblich getrübt	purpur→ blauviolett	gelblich getrübt	560–590 mμ
Dioxycholeinsäure Fp 256°C	„	„	„	„
Apocholeinsäuremethylester Fp 86–88°C	„	„	„	„
Dioxycholeinsäuremethylester Fp 93–95°C	„	„	„	„
Dioxycholadiensäure Fp 236°C	„	—	—	—
Dehydroapocholeinsäure Fp 100–110°C	„	—	—	—
β-Cholensäure Fp 142°C	weiss getrübt	—	—	—
Desoxycholeinsäure Fp 173°C	„	schwach gelblich	—	—
Alkoholcholeinsäure Fp 125°C	„	„	—	—
Margarincholeinsäure Fp 186°C	gelblich getrübt	—	—	—
Xylolcholeinsäure Fp 183°C	„	—	—	—
Essigcholeinsäure Fp 145°C	„	—	—	—

Dehydridesoxycholsäure Fp 188°C	weiss klar	—	—	—
Choladiensäure Fp 186°C	weiss getrübt	—	—	—
Cheno (Anthropo) des- oxycholsäure Fp 112°C	„	—	—	—
Dehydrochenodesoxy- cholsäure Fp 153°C	„	—	—	—
Hyoglykodesoxychol- säure Fp 150°C	gelblich getrübt	—	—	—
Hyodesoxycholsäure Fp 197°C	weiss getrübt	gelblich getrübt	—	—
Isodesoxycholsäure (Borsche) Fp 208°C	„	—	—	—
7.12-Diketocholansäure- äthylester Fp 157°C	klar	—	—	—
12-Oxycholansäure Fp 90-95°C	„	—	—	—
12-Ketocholansäure Fp 185°C	„	—	—	—

Hammarsten's Reaktion.

Gallesäuren	Farbenumschlag	Absorptionsband
α -Phocaecholsäure Fp 152-156°C	prachtvoll blau od. blauviolett	um D-Linie
α -Phocaetaurochol- säure Fp 100°C	„	„
β -Phocaecholsäure Fp 220-222°C	—	—
β -Phocaetaurocholsäure	—	—
α -Scymnolschwefelsäure	indigoblau od. grünlich blau	β -Streifen zw. C u. E; α -Streifen zw. B u. C.
α -Scymnol Fp 101°C	Blaureaktion positiv	
β -Scymnolschwefelsäure	—	—

Anhang (nach der modifizierten Reaktion).

Substanzen	Farbenumschlag	Absorptionsband
Ergosterin	gelblich rot klar	—
Cholesterin Fp 148 C	—	—
Margarinsäure	—	—
Lecithin	—	—

dass die chromogene Substanz, die sich bei der Reaktion bildet, über die Apocholsäure oder die mit dieser isomeren Säuren durchgeht.

Obwohl diese chromogene Substanz noch nicht im kristallisierten Zustand isoliert werden konnte, so sind doch die Farbenreaktionen derselben gegen die verdünnten Mineralsäuren und gegen die Reagenzien, die für den Nachweis von Vitamin A benutzt werden, höchst interessant. Überraschend ist vor allem, dass die Substanz, die man durch Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf den Cholsäureester erhalten kann, in Chloroformlösung mit dem Carr-Price-Reagens die fast gleiche Farbennuance und ein ähnliches Absorptionsband ($560\text{--}590\text{ m}\mu$) zeigt wie bei Carotinoid ($590\text{ m}\mu$) (Euler, 1928) oder auch bei dem unverseifbaren Teil aus Lebertran. Im letzteren Fall (Heilbron, 1932) kann man im allgemeinen spektroskopisch zwei charakteristische Absorptionsbänder erkennen, von denen das eine um $617\text{ m}\mu$ und das andere um $583\text{ m}\mu$ gelegen ist. Ob die beiden Absorptionsbänder aus derselben Substanz herrühren oder nicht, ist allerdings noch unentschieden. Doch ist hier hervorhebend zu erwähnen, dass der Extinktionsquotient vom ultravioletten Bande um $328\text{ m}\mu$ und auch die physiologische Wirkung des unverseifbaren Teiles aus Lebertran näher mit dem Extinktionsquotienten von dem $583\text{ m}\mu$ Band als mit dem des $617\text{ m}\mu$ Bandes parallel gehen sollen (Gillam, 1931). Obwohl die obenerwähnte Substanz sich in konzentrierter Schwefelsäure nicht blau färbt wie Carotinoide, färbt sie sich doch in 55%iger Schwefelsäure und in konzentrierter Ameisensäure grünlich blau. Und zwar wird diese Substanz aus der ätherischen Lösung von der 25%igen Salzsäure- oder der 55%igen Schwefelsäurelösung aufgenommen und die Säureschicht wird grünlich blau gefärbt, abgesehen von einer geringen Nuanceverschiedenheit, fast genau so, wie es bei den sauerstoffhaltigen Carotinoiden, besonders beim Violaxanthin (Kuhn 1931) der Fall ist. Hervorzuhebend ist auch, dass diese chromogene Substanz die Fähigkeit, in der Luft autoxydabel zu sein, und dadurch die Reaktionsfähigkeit gegen Reagenzien u.a. gegen Antimontrichloridreagens zu verlieren scheint.

Was das Vitamin im Lebertran betrifft, so wird von Takahashi (1922) und Shimizu u. Hatakeyama (1929) behauptet, dass es ein Sterin sei, während nach Moore (1931) das Vitamin A aus dem Carotin im Tierorganismus gebildet wird und nach Karrer (1931) ein Carotinderivat ist. Es ist allerdings verfrüht, allein auf Grund der obigen Ergebnisse die strukturelle Beziehung zwischen der chromogenen Substanz aus Cholsäure und dem unverseifbaren Teil aus Lebertran oder den Carotinoiden zu erörtern. Doch dürfte es erlaubt sein anzunehmen, dass alle chromogene Substanzen eine fast gleiche Atomgruppe im Moleküle enthalten, die die Halochromieerscheinung bedingen muss. Was diese Atomgruppe bei der chromogenen Substanz aus Cholsäure anbetrifft, so würde sie unter Verschiebung der Doppelbindung im Apocholsäuremolekül oder im Molekül einer mit dieser isomeren Säure durch die Wirkung von Salzsäure gebildet werden, und die neu gebildete Doppelbindung würde höchstwahrscheinlich gegen den katalytisch erregten Wasserstoff stark beständig sein. Diese Vermutung mag sich darauf gründen, dass die Reaktionsfähigkeit der chromogenen Substanz aus Cholsäure gegen das Antimontrichloridreagens durch die katalytische Hydrierung nicht beeinträchtigt wird.

EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Modifizierte Hammarstenske Reaktion für Cholsäure.

Ca 2 mg kristallalkoholhaltige od. -freie Cholsäure wird in ein kleines Reagenzglas (Kaliber ca 1 cm) hineingetan und unter Zusatz von 0,5 ccm 37% iger rauchender Salzsäure auf dem Wasserbade 3 Minuten lang vorsichtig erwärmt, bis sich die Lösung unter Trübung gelblich zu färben beginnt. Diese Lösung wird in Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird die Lösung bald oder nach einigen Minuten intensiv violett mit einer grünlichen Nuance gefärbt und zeigt schon nach 5–8 Minuten eine prachtvoll blauviolette Farbe. Die Lösung wird unter Verdünnung mit konzentrierter Salzsäure oder mit Alkohol spektroskopiert. Dann ist ein deutliches Absorptionsband in der D-Linie (560–590 m μ)

zu erkennen, wie es auch Hammarsten in seinem Versuche beobachtet hat.

Hier ist zu bemerken, dass bei Anwendung des Materials in einer noch kleineren Menge oder bei unreinem und nässendem Material die gelbliche Farbe beim Erwärmen der Lösung verspätet oder gar nicht auftritt. In solchen Fällen hat es keinen Zweck, länger als 3 Minuten zu erwärmen. Sonst wird die Salzsäure durch zu langes Erwärmen unnötig verdampft, wodurch die Reaktion erschwert wird. Wenn man 0,5 ccm rauchende Salzsäure (37%) 3–4 Minuten lang siedend erwärmt, so wird die Konzentration der Lösung bis auf ca 25% herabgesetzt, und gerade die 25%ige Salzsäure ist für diese Reaktion, wie Hammarsten gezeigt hat, zweckmässig. Bei der Anwendung von Cholsäure in einer Menge von über 2 mg ist die Reaktion zur Genüge erreicht, ohne dass man 3 Minuten lang zu erwärmen, also ohne dass man den Salzsäuregehalt der Lösung auf 25% herabzusetzen braucht, wie Hammarsten bemerkt hat.

Hervorzuheben ist, dass mit der modifizierten Methode die Cholsäure im Kristallgemisch oder in der Körperflüssigkeit, z. B. in der Galle, nachweisbar ist.

10 ccm Fistelgalle des Hundes wurden mit Wasser zehnfach verdünnt und unter Zusatz von 10 g Ba(OH)_2 12 Stunden lang hydrolysiert. Nach der Filtration wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure angesäuert und wieder filtriert. Der mit kaltem Wasser gut gewaschene Rückstand wurde bei Zimmertemperatur getrocknet. Eine kleine Menge dieses Rückstands zeigte bei Erwärmen mit rauchender Salzsäure nach 30 Minuten oder noch früher eine prachtvoll blauviolette Farbe und das charakteristische Absorptionsband. Mit diesem Material ist die Mylius'sche Reaktion negativ, aber die originale Hammarstenreaktion schwach positiv, allerdings hat die Lösung erst nach 16 Stunden eine schwach grünviolette Farbe und das charakteristische Absorptionsband gezeigt.

II. Empfindlichkeit der modifizierten Hammarstenreaktion.

Die modifizierte Hammarstensen'sche Reaktion für die Chol-

säure tritt schon bei Vorhandensein einer minimalen Menge Cholsäure auf. Daher ist sie zweckmässig, um kleine Mengen von Cholsäure im Kristallgemisch der Gallensäure oder in der gallensäurehaltigen Flüssigkeit aufzufinden. Um die Empfindlichkeit der neuen Reaktion zu prüfen, habe ich die Untersuchung mit den verschiedenen Präparaten der Gallensäure angestellt.

a) *Reine Cholsäure.*

0,1 ccm einer 1%igen alkoholischen Cholsäurelösung (1 mg) wurde auf dem Wasserbade von Alkohol befreit und getrocknet. Diese Substanz wurde unter Zusatz von 0,5 ccm rauchender Salzsäure 3 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt und in Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einiger Zeit färbt sich die Lösung grünlich blau, dann violett. Es zeigt sich das charakteristische Absorptionsband. Mit 0,1 mg Cholsäure (0,1 ccm einer 0,1%igen Lösung) tritt nach einiger Zeit nur eine grünliche Trübung auf, während sich dabei das charakteristische Absorptionsband zeigt. Mit 0,01 mg Cholsäure (0,1 ccm einer 0,01%igen Lösung) zeigt sich weder blaue Färbung noch Absorptionsband.

Die modifizierte Hammarstenreaktion tritt also bei reiner Cholsäure in der folgenden Grenzkonzentration auf: Cholsäure: HCl=5 mg: 25 ccm, während die Hammarstense Reaktion in der Konzentration: Cholsäure: HCl=15–20 mg: 25 ccm negativ ausfallen soll. Die modifizierte Reaktion ist also viel empfindlicher als die originale Hammarstense Reaktion.

b) *Gemisch von Cholsäure und Desoxycholsäure.*

Das Gemisch enthält 1% Cholsäure. Mit dem Gemisch fällt die von Vahlen modifizierte Methode negativ aus. Mit der modifizierten Hammarstensen Reaktion ergaben sich die folgenden Reaktionen:

10 mg	Gemisch	(0,1 mg Cholsäure)	keine Färbung
30 mg	„	(0,3 mg „)	gelbgrün u. Absorptionsband
60 mg	„	(0,6 mg „)	deutlich gelbgrün u. Absorptionsband

c) *Gemisch von Cholsäure und Xylolcholeinsäure.*

Das verwendete Gemisch enthält 10,0, 5,0 und 2,5% Cholsäure. Hierbei wurde die neue Reaktion mit der Vahlenschen oder der originalen Hammarstensen'schen Reaktion verglichen.

Methode \ Gallen- säure	10% Gemisch, 5 mg (0,5 mg Cholsäure)	5% Gemisch, 5 mg (0,25 mg Cholsäure)	2,5% Gemisch, 5 mg (0,125 mg Cholsäure)
nach Vahlen	schwach grün	—	—
nach Hammarsten (0,5 ccm 25% HCl)	—	—	—
modifizierte neue	purpur blau u. Absorptions- band	schwach purpur u. Absorptions- band	— —

Aus der Tabelle lässt sich ersehen, dass durch die Vahlensche Methode 2,5–5,0%ige Cholsäure im Gemisch (5 mg) nicht nachweisbar ist, während durch die neue Reaktion 5%ige Cholsäure im Gemisch (5 mg) noch recht gut nachweisbar ist. Mit der Hammarstensen'schen Reaktion ist in allen Fällen die Cholsäure nicht nachweisbar.

d) *Cadechol (Campfercholeinsäure) von Ingelheim.*

Bei Cadechol ist die Cholsäure mit der Mylius'schen Reaktion nicht nachweisbar. Auch mit der originalen Hammarstensen'schen Reaktion wurde die Cholsäure in Cadechol nicht nachgewiesen, während mit der Vahlenschen Methode das Cadechol manchmal eine blaue oder grüne Farbe ergab.

Mit der modifizierten Hammarstensen'schen Probe hat eine Messerspitze davon nach einer Stunde eine schwache Purpurfärbung und das charakteristische Absorptionsband gezeigt. Nach 12 Stunden ging die erstere in blauviolette Farbe über, und das Absorptionsband wurde viel deutlicher. Diese blaue Färbung dauerte bis zum nächsten Tage an.

Isolierung von Cholsäure aus Cadechol.

50 g Cadechol wurden mit Ammoniaklösung gegen Lackmus

alkalisch gemacht. Diese Lösung wurde auf dem Wasserbade mehrere Stunden erwärmt, bis der ungelöste Campfer auf dem Wasser schwamm.

Die vom Campfer abfiltrierte Lösung wurde mit einer 10%igen Bariumchloridlösung versetzt und von dem ausgefallenen Choleinsäuresalz abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene Fällung abgenutscht und mit Wasser gut gewaschen. Dieser Niederschlag (1,4 g) wurde gut getrocknet. Durch Digerieren mit ein wenig absolutem Alkohol wandelt sich der Niederschlag in Kristallbrei um. Die sich in Tetraedern kristallisierende Säure, die aus Alkohol mehrmals umkristallisiert wurde, schmilzt bei 198°C und zeigt mit der reinen Cholsäure keine Schmelzpunktdepression.

Sie gibt positive Myliussche und die modifizierte Hammarstensche Reaktion.

Titration: 78,1 mg Subst. brauchten 1,95 ccm $N/10$ NaOH.

Äquivalent für $C_{24}H_{40}O_5$ Ber. 408 Gef. 401.

Die Cholsäure ist also im Cadecholpräparat nachgewiesen worden.

III. Chromogene Substanz in der Hammarstenschcn Reaktion.

Erwärmt man 1 g Cholsäureäthylester vom Fp 158–159°C in 30 ccm rauchender Salzsäure (37%) ca 1 Minute lang auf dem Wasserbade und lässt die Lösung dann in Zimmertemperatur stehen, so nimmt diese allmählich eine prachtvoll purpurblaue Farbe an. Nach ca 9 Stunden verdünnt man sie mit Wasser und stumpft die saure Reaktion der Lösung mit verdünnter Natronlauge oder Natriumcarbonatlösung ab. Der dabei abgeschiedene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gründlich nachgewaschen und dann im Vacuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,5 g. Die erhaltene, pulvrige gelbe Masse löst sich leicht in den meisten organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme von Petroläther und Äther, und zwar löst sie sich im letzteren ziemlich schwer, im ersteren gar nicht. Sie entfärbt die sodaalkalische Permanganatlösung und die Bromeisessiglösung.

Ihre Chloroformlösung ergibt die folgende Farbenreaktion;

Reagens	Farbe	Absorptionsband	Remerkungen
SbCl_3 —	grünlich blau	560–590 $\text{m}\mu$	Eine geringe Menge Alkohol muss dem Reagens zugesetzt werden.
AsCl_3 —	„ „	„ „	Nach einiger Zeit ist das andere schmale deutliche Absorptionsband zwischen 650 u. 680 $\text{m}\mu$ sichtbar.
CHCl_3COOH —	prachtvoll blau	„ „	

Die ätherische Lösung derselben wurde von 25%iger Salzsäure- und 55%iger Schwefelsäurelösung aufgenommen, und die Säureschicht zeigte sofort die grünlichblaue Farbe. Die chromogene Substanz löst sich in konzentrierter Ameisensäure und der Farbumschlag der Lösung findet in folgender Reihe statt: purpur – grünlich blau – blaviolett. Wenn man das im Vacuum gut getrocknete Reaktionsprodukt an der Luft stehen lässt, so kann man seine allmähliche Gewichtszunahme beobachten. Es zeigt nicht mehr eine grünlich blaue, sondern eine gelblich schwarze Farbe, wenn man Antimontrichloridreagens auf das Reaktionsprodukt tropft. Diese Erscheinung ist, wie man es wohl auch bei Ergosterin und Carotinoid beobachtet, höchstwahrscheinlich durch die Oxydation an der Luft bedingt. Wenn man das Reaktionsprodukt in absolutem Alkohol längere Zeit katalytisch hydriert, so wird unter Aufnahme von Wasserstoff die anfangs gelbe Lösung entfärbt. Die hydrierte Substanz färbt sich jedoch durch das Antimontrichloridreagens sofort grünlich blau, ebenso gut wie die nicht hydrierte.

LITERATUR.

- Boedecker, F. (1920): Ber. chem. Ges., **53**, 1852.
 Boedecker, F. u. Volk, H. (1921): Ber. chem. Ges., **54**, 2489.
 Borsche, W. u. Frank, R. (1926): Ber. chem. Ges., **59**, 1748.
 Borsche, W. u. Todd, A. R. (1931): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **197**, 173.
 Euler, B. v., Euler, H. v. u. Hellström, H. (1928): Bioch. Zeitschr., **203**, 370.

- Gillam, A. E. u. Morton, R. A. (1931): *Bioch. Jl.*, **25**, 1346.
Hammarsten, O. (1909): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **61**, 495.
Heilbron, I. M., Helslop, R. N., Morton, R. A. u. Webster, E. T.,
Rea, I. L. u. Drumond, J. C. (1932): *Bioch. Jl.*, **26**, 1179.
Hoshijima, T., Takata, H., Shibuya, S. u. Uraki, Z. (1931):
Diese *Zeitschr.*, **12**, 393.
Karrer, P., Morf, R. u. Schoepp, K. (1931): *Helv. Chem. Act.*, **14**,
1036.
Kuhn, R. u. Wintersten, A. (1931): *Ber. chem. Ges.*, **64**, 326.
Moore, T. (1929; 1930; 1931): *Bioch. Jl.*, **23**, 803; **24**, 692; **25**, 275.
Mylius, F. (1887): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **11**, 306.
Nakagawa, S. u. Fuzikawa, H. (1931): Diese *Zeitschr.*, **12**, 399.
Oerum, H. P. T. 1904): *Skand. Arch. f. Physiol.*, **16**, 273.
Shimizu, T. u. Hatakeyama, T. (1929): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*,
182, 57.
Shimizu, T., Oda, T. u. Makino, H. (1932): *Zeitschr. f. Physiol.*
Chem., **213**, 136.
Takahashi, K. (1922): *Proc. Chem. Soc. Japan.*, **43**, 828.
Vahlen, E. (1895): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **21**, 262.
Wieland, H. u. Reverey, G. (1924): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **140**,
186.
Wieland, H. u. Deulofeu, V. (1931): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*,
198, 127.
Windaus, A. (1926): *Ann. d. Chem.*, **447**, 233.
Windaus, A. u. Schoor, A. v. (1928): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*,
173, 312.
Windaus, A. u. Schoor, A. v. (1926): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*,
161, 143.
Windaus, A. Bohne, A. u. Schwarzkopf, E. (1924): *Zeitschr. f.*
Physiol. Chem., **140**, 177.
Yonemura, S. (1926): Diese *Zeitschr.*, **6**, 287.

VORKOMMEN DER TAUROCHOLSÄURE IN DER HÜHNERGALLE.

VON

KAZUMI YAMASAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 5. Juli 1933)

Es wurde schon erwähnt, dass mit der neuen modifizierten Hammarstenschen Reaktion (Yamasaki) auch noch eine Spur von Cholsäure im Kristallgemisch nachweisbar ist. Durch Anwendung dieser Methode ist es mir nun gelungen, die Cholsäure in der Hühnergalle nachzuweisen und zu isolieren und sogar zu zeigen, dass sie mit Taurin gekuppelt vorhanden ist. Es sind also in der Hühnergalle drei Gallensäuren: Chenodesoxycholsäure (Windaus, 1926) am meisten, Isolithocholsäure (Hoshijima u. a., 1931), und Cholsäure am wenigsten gefunden worden, und zwar sind sie alle höchstwahrscheinlich mit Taurin gekuppelt vorhanden.¹⁾

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Einem Liter schleimfreier Hühnergalle wurde ca 1/2 Liter einer 5%igen Eisenchloridlösung zugesetzt. Das dabei abgeschiedene feste Eisensalz wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht, abfiltriert und abgedampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert. Der getrocknete Alkoholextrakt wurde in Wasser gelöst und dann das obige Verfahren noch einmal wiederholt.

1) Ob die Chenodesoxycholsäure mit Taurin gekuppelt vorhanden ist, steht noch nicht fest. Doch scheint sie mir sicher mit Taurin verbunden in der Hühnergalle vorhanden zu sein. So konnte man aus der durch Eisenchloridlösung gefällten Fraktion der Hühnergalle eine in Wasser leicht lösliche, harzige, gepaarte Säure isolieren, die durch Hydrolyse die Chenodesoxycholsäure und Taurin lieferte. (Heinz u. Wislizenus. Pogg. Ann., 108, 1859.)

Die so gereinigte bräunlich gelbe Masse, die süßlich bitter schmeckt, wurde in der üblichen Weise hydrolysiert und unter Ansäuerung ausgefällt. Die abgeschiedene, schwach gelbe Masse wurde in Ammoniaklösung gelöst, mit 10%iger Bariumchloridlösung ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde wieder unter Ansäuerung ausgefällt.

Die abgeschiedene Masse (ca 0,1 g) wurde nach dem Trocknen in ein wenig absolutem Alkohol digeriert und abfiltriert. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Essigester, dann nach mehrmaligem aus verdünntem Alkohol wurde ein Nadelkristall erhalten, der bei 195–196°C schmilzt. Der Mischschmelzpunkt mit der reinen Cholsäure zeigt keine Depression.

Spezifische Drehung: 0,0732 g Subst., 10 ccm abs. Alkohol, 1 dm,

$$\alpha = +0,22^{\circ}, \quad [\alpha]_D^{20} = +30,05^{\circ}.$$

Sie zeigt Myliussehe und die modifizierte Hammarstensche Reaktion. Es liegt also ohne Zweifel Cholsäure vor. Aus dem Hydrolysat habe ich nach Hammarsten einen schwefel- und stickstoffhaltigen Kristall isoliert. Er (ca 0,05 g) kristallisiert in Nadeln und ist in Alkohol schwer, in Wasser leicht löslich. Daher ist er ohne weiteres Taurin.

Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, dass die Taurocholsäure in kleinster Menge in der Hühnergalle vorhanden ist.

LITERATUR.

- Hoshizima, T., Takata, H., Shibuya, S. u. Uraki, Z. (1931): Diese Zeitschr., **12**, 393.
 Windaus, A. u. Schoor, A. v. (1926): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **161**, 143.
 Yamasaki, K. (1933): Diese Zeitschr., **18**, 311.

DIE WIRKUNG VON PEPSINPRÄPARATEN VERSCHIEDENER AKTIVITÄT AUF MUSKELGLOBULINE UND KOLLAGEN.

VON

J. A. SMORODINZEW UND A. N. ADOWA.

*(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie des chem.-technolog.
Institutes für Fleischindustrie zu Moskau.)*

(Eingegangen am 11. Juli 1933)

Auf Grund der in unserer jüngst erschienenen Mitteilung (Smorodinzew u. Adowa, 1933) geäußerten Vermutungen haben wir unsere Untersuchungen über die nativen Eiweisskörper des Muskels, Globulin und Kollagen, die Vorsteher zweier verschiedenen Eiweissgruppen, der einen mit basischen, der anderen mit sauren Eigenschaften, sind, angestellt. Wir haben festgestellt, dass sich ein wesentlicher Unterschied zwischen der Viskositätsveränderung dieser beiden Eiweisskörper während der Verdauung mit verschiedenen Pepsinpräparaten wahrnehmen lässt. Da aber die Viskositätsbestimmung für die quantitative Prüfung des Prozessverlaufes nicht sehr gut geeignet ist, entstand die Notwendigkeit, die Untersuchung durch quantitative Bestimmungen des Substratschwundes und der Anhäufung der Verdauungsprodukte zu ergänzen.

Die Viskositätsbestimmung gibt hauptsächlich ein Bild der qualitativen Veränderungen, die sich im Laufe des Prozesses abspielen. Zur quantitativen Feststellung der Verdauungsprodukte kann man die Formoltitration anwenden, und zur Bestimmung des verdauten Eiweisses bestimmt man den Stickstoffgehalt des unverdauten Restes. Die Vergleichung der mit diesen Methoden erhaltenen Resultate gibt nun ein mehr oder weniger vollständiges Bild über die Wirkung des Pepsins auf Eiweiss.

Durchführung der Analyse.

Das sorgfältig von Fett und Fascie befreite Fleisch (oder in

entsprechenden Fällen Muskel- und Bindegewebefasern) wird dreibis viermal durch einen Fleischwolf getrieben. Von diesem Fleischbrei wurden Proben von 1 bis 6 g entnommen mit 10 bis 100 Volumen Pepsinlösung von gewünschter Konzentration übergossen und in den Thermostaten bei 40–41° gestellt. Nach Verlauf der Verdauungszeit wurde das Gemisch auf Eis gestellt, um den fermentativen Prozess zu unterbrechen. Das Gemisch wurde filtriert und der Titration nach Henriques und Gjaldbeck (1911) unterworfen.

I. Stadium.—Es wurde eine Voruntersuchung zur Feststellung des neutralen Punktes durchgeführt, indem man zu 10 ccm des Filtrats 3 Tropfen 0,5% alkoholischer Lösung von Rosolsäure zufügte und mit 0,5 N Natronlauge titrierte. Nachher wurden 10 ccm des Filtrats gegen Phenolphthalein (5 Tropfen) mit 0,5 N Natronlauge bis zur schwachen Rosafärbung titriert. Von der verbrauchten Natronlauge ist die anfänglich verbrauchte Menge abzuziehen—der Rest entspricht dem 1. Stadium.

II. Stadium.—Die Titration mit Natronlauge wird bis zu starker Rosafärbung fortgesetzt bis keine Farbvertiefung mehr stattfindet. *III. Stadium.* Ferner, fügt man 10 ccm gegen Phenolphthalein neutrale Formaldehydlösung hinzu (die Lösung entfärbt sich) und titriert mit Natronlauge bis zur schwach Rosafärbung. *IV. Stadium.* Endlich wurde die Titration bei stark Rosafärbung beendet (Kontrollprobe auf Formalin).

Die Menge von Natronlauge, die in den verschiedenen Stadien verbraucht wurde, entspricht der Tiefe der Eiweiss-spaltung und zeigt die Verlaufsrichtung des Prozesses, gibt auch Kunde über den Charakter der Spaltprodukte.

I. Die Einwirkung von Pepsin auf präparierte Muskel- und Bindegewebefasern.

Die Viskositätsveränderung der Bestandteile des Muskelgewebes bei Pepsinverdauung deutet darauf hin, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen reinen Muskelfasern und Bindegewebefasern herrscht. Mittels Formoltitration haben wir festgestellt, dass während 24 stündiger Verdauung reine Muskelfasern

um 40–70% besser als Bindegewebefasern verdaut werden (IV. Stadium), wobei eine wesentliche (60–240%) Anhäufung von Carboxylgruppen der Monoaminodicarbonsäuren stattfindet. (I. Stadium).

TABELLE I.

Die Einwirkung von Pepsin auf Bindegewebe- und Muskelfasern.

Verdauungs- dauer.	Bindegewebefasern			Muskelfasern.		
	15 Min.	24 St.	Zunahme.	15 Min.	24 St.	Zunahme.
PH	1,19	1,089		1,05	1,329	
I. Stad.	0,25	0,65	0,4	0,35	1,0	0,65
IV. Stad.	0,4	1,6	1,2	0,75	2,45	1,70
I./IV. Stad.	1,6	2,3		2	2,5	
PH	1,19	1,086		1,05	1,312	
I. Stad.	0,25	0,5	0,25	0,35	1,20	0,85
IV. St.	0,4	1,45	1,05	0,753	2,55	1,80
I./IV. Stad.	1,6	3		2	2	

Das Verhältnis zwischen dem I. Stadium und dem IV. Stadium (nach Abziehung des Kontrollwertes) ist ziemlich hoch. Das deutet darauf hin, dass bei der Verdauung nicht einzelne Aminosäuren sondern Polypeptide entstehen. Das Verhältnis zwischen Muskel- und Bindegewebefasern zeigt keinen nennenswerten Unterschied. Daraus darf man schliessen, dass der Mechanismus der Einwirkung von Pepsin auf beide Eiweissarten gleich bleibt.

Bei Vergleichung der Verdauung von präparierten Muskelfasern eines jungen und eines ausgewachsenen Tieres erwies sich, dass die ersteren von 80% (IV. Stadium) bis 160% (I. Stadium) schlechter verdaut werden. Bei der Verdauung der Bindegewebefasern tritt der Altersunterschied schwach hervor. Die Verdauung ist ein wenig besser beim Kalbe, aber auch hier sehen wir, dass reine Muskelfasern des Kalbes beinahe zweimal besser verdaut werden, als Bindegewebe des ausgewachsenen Tieres. (Tab. II.) Die sauren Muskelglobuline ebenso wie das saure Casein werden durch Pepsin besser verdaut als die basischen Eiweisskörper

TABELLE II.

Verdauung der Muskel- und Bindegewebefasern des Kalbes
und des ausgewachsenen Tieres.

	Verdauungsdauer 24 St. Muskelfasern			Bindegewebefasern		
	des Kalbes	des aus- gewachse- nen Tieres.	Differenz.	d. Kalbes	des aus- gewachse- nen Tieres.	Differenz.
PH	1,601	1,703		1,953	1,894	
I. Stad.	0,45	1,20	0,75	0,6	0,5	-0,1
IV. Stad.	1,4	2,55	1,15	1,55	1,45	-0,1
I./IV. St.	3	2		2,6	3	

Kollagen und Gelatine. Während bei Pepsinverdauung von Gelatine die Viskosität des Verdauungsgemisches keine Änderung zeigt, steigt bei der Kollagenverdauung die Viskosität sehr stark.

II. Die Verdauung des Fleisches in bezug auf die Fleischsorte.

Die Sorte des Fleisches wird nach dem relativen Gehalt an Bindegewebe bestimmt: je mehr Bindegewebe das Fleisch enthält, desto minderwertiger ist die Fleischsorte und desto billiger ist sein Marktpreis. Wir stellten fest, dass Muskelfasern bedeutend besser verdaut werden als Bindegewebefasern. Daraus folgt: je reicher der Gehalt des Fleisches an Bindegewebefasern ist, desto schlechter wird es verdaut. Diese Vermutung ist durch Versuche bestätigt worden. Aus der grossen Zahl der Versuche, die von uns ausgeführt worden sind, bringen wir hier diejenigen, welche über Verdauung verschiedener Fleischsorten mit ein und derselben Pepsinlösung angestellt wurden. Wir benutzten Fleischbrei aus Hinterschenkel (I. Sorte) und Flanken (II. Sorte). Der Fleischbrei wurde 8 Tage in gefrorenem Zustande aufbewahrt. (Tab. III.) Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die minderwertige Sorte (Flanken), welche entsprechend mehr Bindegewebe enthält, nach 24 Stunden um 25-30% weniger verdaut worden ist, als das Fleisch der ersten Sorte.

TABELLE III.

Die Verdauung des Fleisches in bezug auf die Fleischsorte.

Verdauungsdauer	15 Min.	3 St.	Zunahme	24 St.	Zunahme.
Hinterschenkel 1:10					
PH	1,728	1,831		2,023	
I. Stad.	0,6	1,2	0,6	1,7	1,1
IV. Stad.	2,25	3,15	0,9	4,55	2,3
I./IV. Stad.	3,8	2,6		2,7	
Flanke 1:10					
PH	1,346	1,45		1,606	
I. Stad.	0,8	1,1	0,3	1,3	0,5
IV. Stad.	2,35	3,55	1,2	3,6	1,25
I./IV. Stad.	3	3,2		2,8	

III. Das Verhältnis zwischen der Viskosität des Verdauungsgemisches und der Zunahme der erforderlichen Menge von Natronlauge.

Um das Verhältnis zwischen Viskositätsveränderung und den Resultaten der Formoltitration festzustellen, wurden Versuche nicht mit Fleischbrei sondern mit Caseinlösung angestellt.

Die Nebeneinanderstellung der Viskositätsveränderung mit den Resultaten der Formoltitration von Caseinlösung bei Pepsinverdauung mit Präparaten verschiedener Aktivität ergibt ein interessantes Bild: mit schwachen Präparaten (N 4) (Smorodinzew u. Adowa, 1928) findet ein allmählicher Abfall im Verbrauch der Natronlauge im I. Titrationstadium statt; und er erreicht ein Minimum, wenn die Viskosität ihr Maximum erreicht (nach 4 Stunden) Tab. V.

Der Verbrauch der Lauge im IV. Stadium ändert sich kaum. Das Verhältnis zwischen den Stadien erreicht seinen maximalen Wert bei dem grössten Viskositätswert und fällt dann wieder ab.

Bei Verdauung mit starken Pepsinpräparaten entspricht der Abfall der Viskosität von ihrem maximalen Werte am Ablaufe der zweiten Stunde ein Verbrauch von grösseren Laugemengen

TABELLE IV.

Das Verhältnis zwischen der Viskosität und der verbrauchten
Natronmenge bei Caseinverdauung mit schwachen
Pepsinpräparaten./N./.

Verdauungs- dauer.	Gleich nach d. Mischung.	1 St.	2 St.	3½ St.	Zunah- me	24 St.	Zunah- me
Viskosität	186"	235"	4380"	7200"	—	715"	—
Titrationstad.							
I. Stad.	0,7 cm	0,65	0,6	0,45	—	0,75	—
IV. Stad.	1,5	1,5	1,65	1,65	0,15	2,10	0,6
I./IV. Stad.	2,1	2,3	2,8	3,7	—	2,8	—
pH.	1,502	1,554	1,71	1,703		1,682	

(beinahe um das Doppelte im I. Stadium und um 44% im IV. Stadium). Dann fällt die Menge ab.

TABELLE V.

Das Verhältnis zwischen Viskosität und der verbrauchten Lauge bei
Verdauung mit starken Präparaten N₂.

Verdan- ungsdauer.	Gleich nach d. Mischung.	Nach 1 St.	Nach 2½ St.	Nach 3 Stund.	Zunah- me.	Nach 4 St.	Nach 24 St.	Zunah- me.
Viskosität	192"	1800"	457"	435"		346"	239"	
I. Stad.	0,45	0,40	0,95	0,80		0,85	1,0	
IV. Stad.	1,85	1,95	2,80	2,55	0,7	2,50	2,95	1,10
I./IV. Stad.	4	5	3	3		3	3	
pH.	1,433	1,658	1,656	1,658		1,658	1,658	

Das Verhältnis zwischen den Titrationsstadien erreicht seinen maximalen Wert auch bei hoher Viskosität, dann fällt das Verhältnis und bleibt dann fast konstant.

Diese Beobachtung wirft Licht auf den Mechanismus der Pepsinwirkung auf Eiweisskörper: die erste Etappe der Einwirkung des Ferments besteht in Aggregierung der Eiweissmicelle, infolge deren die Viskosität stark steigt; eine Zunahme der Lauge bei Titration fehlt aber, da ein Zerfall der 60-NH-Koppelung nicht stattfindet. Gleichzeitig mit dem Abfall der Viskosität steigt die

Menge der verbrauchten Lauge, was auf die Anhäufung der COOH-Gruppen infolge des Zerfalls der grossen Aggregate in kleine Polypeptidkomplexe zu beziehen ist. Bei Verdauung mit schwachem Präparate d.h. bei einer geringen Konzentration des Ferments entwickelt sich dieser Prozess sehr langsam, erst am 2-ten, 3-ten Tage kommt eine Abspaltung der Bruchstücke zustande. Mit starken Präparaten d.h. bei grösserer Konzentration des Ferments geht das I. Stadium schneller vor sich und endet nach 24 Stunden, so dass ein tiefer Zerfall des Eiweisses sehr bald erfolgt. Die Übereinstimmung des Umschlagmomentes und des Abfalles der Viscosität mit dem gesteigerten Verbrauch von Lauge bestätigt unsere Kommentare für den Verdauungsprozess der Eiweisskörper.

Obwohl Muskelglobulin und Casein zu den "sauren" Eiweisskörpern gehören, zeigen sie doch ein verschiedenes Verhalten gegen Pepsin. Dieses beruht auf dem spezifischen Aminosäure-Gehalt und der Struktur dieser Eiweisskörper, die sich voneinander sehr stark nach ihren Eigenschaften unterscheiden. Ein noch grösserer Unterschied herrscht im Verhältnis des Ferments gegen die denaturierten Eiweisskörper Gelatine und Kollagen. Das letztere wird, wie bekannt ist, durch Kochen mit Wasser hergestellt. Man darf vermuten, dass die Einwirkung von heissem Wasser eine neue Verteilung in den Molekülen des Kollagen schafft: eine Befreiung und Anhäufung von hydrophilen Carboxyl- und Aminopruppen, die dem im Wasser unlöslichen Kollagen die Löslichkeit von Gelatine mitteilt.

Wir prüften zwei neue, unveränderte, native Eiweisskörper Muskelglobulin und Kollagen als Vorsteher "saurer" und "basischer" Eiweisskörper und haben festgestellt, dass sie ein verschiedenes Verhalten gegen Pepsin zeigen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das "saure" Muskelglobulin wird leichter als das "basische" Kollagen durch Pepsin verdaut.

2. Bei Pepsinverdauung von Kollagen steigt im Gegensatz zur Gelatineverdauung die Viskosität des Gemisches.

3. Bei der Steigerung der Viskosität des Verdauungsgemisches findet kein Verbrauch von Lauge statt.

4. Bei Abfall der Viskosität des Verdauungsgemisches erscheint ein Sprung im Verbrauch der Lauge.

5. Die erste Etappe bei der Eiweissverdauung besteht in einer Aggregierung der Eiweissmicelle, Viskositätssteigerung ohne Zerspaltung der Peptidkoppelung.

6. Die Verdauung des Fleisches *in vitro* kann zur Abschätzung der Fleischsorte dienen.

LITERATUR.

Henriques u. Gjaldbek (1911): Zs. physiol. Chem., **71** u. **75**.

Smorodinzew J. A. u. Adowa A. N. (1928): Zs. f. physiol. Chem., **177**, 187.

Smorodinzew u. Adowa (1933): Fermentforsch., **13**, 363.

STUDIES ON A DIAMINO ACID, CANAVANIN.

III. The constitution of canalin.

By

MATSUNOSUKE KITAGAWA AND SHIN-ICHI MONOBE.

(*Biochemical Laboratory, Department of Agriculture,
Kyushu Imperial University, Fukuoka.*)

(Received for publication, July 13, 1933)

In a previous paper (1932) we reported on the nature of canalin, a new monoamino acid having a molecular formula $C_4H_{10}O_3N_2$, which is produced on the hydrolysis of canavanin by a liver ferment, canavanase.

We presently ascertained that canalin undergoes reduction by means of hydrogen in the presence of platinum black to convert into α -amino- γ -oxy butyric acid liberating ammonia. On the other hand, in the molecule of canalin originally no presence of hydroxyl group was proved after studying the properties of some derivatives of canalin. Accordingly the following conclusion was reached as to the mechanism of reduction; namely, that on reduction of canalin its non-amino nitrogen is liberated as ammonia and at the same time hydroxyl group is first set free thereafter in the reduction product, α -amino- γ -oxy butyric acid.

These observations led us to assume that non-amino nitrogen is combined with oxygen in the form of *o*-hydroxylamino group, $-ONH_2$, in canalin.

I. HYDROGENATION OF CANALIN.

I. Hydrogenation in the presence of platinum black.

3 gm. of canalin were hydrogenated in 30 ccm. of glacial acetic acid solution with 1.5 gm. of platinum black. The reaction ceased after 3 hours and a half. The hydrogen absorbed amounted to 0.0129 gm., which is 96 per cent of that required by theory, when

one molecule of canalin is considered as absorbing two atoms of hydrogen.

The occurrence of ammonia on reduction of canalin.

In the reduction mixture a large amount of ammonia was detected by the usual method; for example, 0.1373 gm. of canalin was completely hydrogenated in glacial acetic acid and then the resulting ammonia was determined by the usual method as follows:

ammonia found. 12.46 mg. as nitrogen.

It is 87 per cent of that required by theory, when one molecule of NH_3 is considered as produced from one molecule of canadin.

The occurrence of α -amino- γ -oxy butyric acid on reduction of canalin.

2.1484 gm. of canalin were hydrogenated in absolute methyl alcohol with 1 gm of platinum black. The reaction ceased after 4 hours and, on opening the cock, the reacting flask was found to be filled full of ammonia gas. The hydrogenated product was dissolved in a small amount of water, and, after removing the ammonia, it was crystallized out by adding absolute alcohol. The product obtained was proved to be α -amino- γ -oxy butyric acid because of its decomposing at 201° , and other properties. The yield at the first crystallization amounted to 0.3670 gm., which is 106 per cent of that required by theory, if one molecule of canalin is considered to convert into one molecule of α -amino- γ -oxy butyric acid.

Accordingly the following chemical equation is suggested for the hydrogenation of canalin.



II. α -Amino- γ -oxy butyric acid.

The reduction product above mentioned was recrystallized in lustrous crystals from the alcoholic solution. It has a weak sweet taste, decomposes at 201° , gives ninhydrin reaction, does not reduce Fehling's solution, and its aqueous solution is almost neutral or very slightly acid to litmus.

Analysis

dried at 110° *in vacuo* (no water of crystalization was observed)

5.535 mg. substance: 8.163 mg. CO₂ and 3.996 mg. H₂O

6.490 „ „ : 0.680 cc. N at 23.5° and 758 mm.

C₄H₉O₃N. calculated. C 40.30, H 7.62, N 11.76

found. C 40.22, H 8.08, N 11.78

Amino nitrogen

(a) determination by Van Slyke's method

7.78 mg. substance (total-N 0.915 mg.)

N found....1.580 cc. at 22° and 758 mm.

amino-N....0.911 mg.

99.56% of total-N

(b) determination by formol method

30.664 mg substance (total-N 3.61 mg.)

n/10 NaOH required for titration....2.65 cc.

102.77% of total-N.

Comparing these results with the observations by Sørensen and Andersen (1908), this compound is identified with *α*-amino-*γ*-oxy butyric acid.

α-Amino-γ-oxy butyro-lactone hydrochloride.

0.8 gm. of this amino acid was dissolved in 4 cc. of 18 per cent HCl solution and evaporated on the water bath. Then its lactone hydrochloride was crystallized out in needles on condensing the solution and recrystallized from the alcoholic solution.

It decomposes at 223–224°, loses one molecule of water of crystallization at about 93°, and its aqueous solution is acid to litmus, but neutral to congo red.

drying

substance air dried.....0.4878 gm.

after being dried at 100° *in vacuo*.....0.4305 gm.

C₄H₇O₂N · HCl · H₂O calculated. H₂O 11.60

found. „ 11.75

Analysis

4.576 mg. substance: 5.867 mg. CO_2 and 2.529 mg. H_2O

5.655 mg. „ : 0.490 cc. N at 23.5° and 765 mm.

0.1725 gm. „ : 0.1806 gm. AgCl

$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{N} \cdot \text{HCl}$ calculated. C 34.90 H 5.86 N 10.18 Cl 25.78
found. „ 34.97 „ 6.18 „ 9.84 „ 25.90

 α -Amino- γ -monoacetyl-oxy-butyric acid hydrochloride.

This amino acid was suspended in excess of acetylchloride without solvent and allowed to stand overnight at room temperature. Then excess of acetylchloride was completely extracted with ether and the acetyl product which remained was dissolved in absolute alcohol and crystallized from the alcoholic solution by adding ether.

It is very hygroscopic, decomposes at about 95° , and its aqueous solution is acid to congo red.

Analysis

dried at 55° *in vacuo*.

3.920 mg. substance: 5.210 mg. CO_2 and 2.544 mg. H_2O

0.0915 gm. „ : 0.0679 gm. AgCl

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N} \cdot \text{HCl}$ calculated. C 36.45, H 6.12, Cl 17.95
found. „ 36.25, „ 7.26, „ 18.36

Formol titration

0.0836 gm. substance (total-N 5.93 mg.).

$n/10$ NaOH required for titration. . . . 8.5 cc.

The number of the titration corresponding to amino nitrogen of this substance, which contains one molecule of HCl, must be a half of the amount observed, namely, $n/10$ NaOH 4.25 cc.

amino-N. . . . 5.95 mg.

100.3% of total-N.

According to the properties of the acetyl derivative, that is, its giving ninhydrin reaction, the formation of salt with hydrochloric acid and the presence of the amino nitrogen titrable in formal, the acetyl group is considered not to combine with the

amino group; in other words, the formation of acetyl derivative from this amino acid indicates the existence of hydroxyl group in it.

α -Monobenzoyl-amino- γ -oxy butyric acid.

2.5 gm. of this amino acid were dissolved in 20.7 cc. of water, and 78 cc. of 2N NaOH and 11.6 gm. of benzoylchloride were added alternately in small quantities during cooling. After the end of reaction, on acidifying the solution with HCl, a crystalline precipitate occurred. But the benzoyl product almost came into the filtrate; then the filtrate was condensed *in vacuo* at 32° and the benzoyl product was crystallized out in needles. After being completely extracted with ligroin, it was recrystallized from its alkaline solution by adding HCl.

It melts at 140–145°, is easily soluble in alcohol and hot water, but soluble with difficulty in cold water, differs from the acetyl derivative in that it does not give ninhydrin reaction and does not form the salt with hydrochloric acid, and its aqueous solution is acid to congo red.

Analysis

9.087 mg. substance: 0.489 cc. N at 20.7° and 766.5 mm.

$C_{11}H_{13}O_4N$ calculated. N 6.29

found. „ 6.18

This benzoyl derivative readily yielded its lactone on warming in the hydrochloric acid solution. The lactone crystallizes in needles, melts at 140°, and its aqueous solution is neutral to litmus.

Analysis

4.385 mg. substance: 0.262 cc. N at 23.8° and 764 mm.

$C_{11}H_{11}O_3N$ calculated. N 6.84

found. „ 6.77

The benzoyl group is considered to combine with the amino group of this amino acid and the formation of lactone indicates the presence of free γ -oxy group in this benzoyl derivative.

No reducibility of canavanin and dibenzoylcanalin by means of hydrogen.

Neither canavanin nor dibenzoyl canalin underwent reduction at all by means of hydrogen in the presence of platinum black. From these points we may suggest that the non-amino nitrogen contained in canalin, which is readily liberated as ammonia on reduction in the case of canalin, is resistant to reduction in the case of dibenzoylcanalin by being combined with the benzoyl group and is stabilized in the case of canavanin by being combined with some group giving urea on hydrolysis by enzyme.

According to the study on the bromination of canalin, the formation of the brominated canalin was not recognized.

II. SOME DERIVATIVES OF CANALIN.

We have ascertained that canalin converts readily into α -amino- γ -oxy butyric acid on reduction. Now for the purpose of determining whether or not such a γ -oxy group was present originally in the molecule of canalin before reduction, we examined the properties of some derivatives of canalin, as follows:

I. Test for the formation of lectone from canalin.

Canalin hydrochloride.

1 gm. of canalin was warmed at 60° in 4 cc. of 18 per cent HCl solution for 3 hours and then the mixture was condensed into a syrup at room temperature. The salt was precipitated on adding absolute alcohol and recrystallized from the alcoholic solution.

It is a little hygroscopic and decomposes at 165–166°.

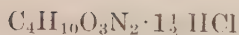
Analysis

dried at 100° *in vacuo* (no water of crystallization was observed)

4.152 mg. substance: 3.897 mg. CO₂ and 2.499 mg. H₂O

7.460 „ „ : 0.972 cc. N at 24° and 763 mm.

0.0493 gm. „ : 0.0536 gm. AgCl



{	calculated.	C	25.43,	H	6.14,	N	14.84,	Cl	28.97
	found.	„	25.60,	„	6.73,	„	14.79,	„	26.89

On the other hand we prepared canalin hydrochloride by means of dissolving canalin in hydrochloric acid solution at room temperature and we obtained just the same hydrochloride as that above mentioned.

Canalin sulphate.

1.5 gm. of canalin was treated in the warm 18 per cent H_2SO_4 solution in the same manner as in the case of hydrochloride, so the canalin sulphate was obtained in just the same composition as hydrochloride, but not lactone.

It decomposes at about 97° and is a little hygroscopic.

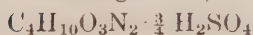
Analysis

dried at 55° *in vacuo* (no water of crystallization was observed)

3.790 mg. substance: 3.331 mg. CO_2 and 1.809 mg. H_2O

5.033 „ „ : 0.595 cc. N at 22.8° and 769 mm.

0.0362 gm. „ : 0.0308 gm. BaSO_4



{	calculated.	C	23.12,	H	5.58,	N	13.49,	S	11.58
	found.	„	23.97,	„	5.34,	„	13.60,	„	11.69

Schulze and Winterstein (1902) have obtained ornithine dihydrochloride from its solution containing free hydrochloric acid, but Jaffe (1877) has obtained an ornithine hydrochloride, having such a composition as $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2 \cdot 1\frac{1}{2} \text{HCl}$, from the solution containing no free hydrochloric acid, which is similar in the condition of isolation to the case of canalin salts.

From these experiments it is ascertained that lactone is not obtained from canalin by the treatment, which usually readily produces lactone from γ -oxy-amino acid; namely, canalin is not considered to contain free γ -oxy group in its molecule.

II. The properties of dibenzoylcanalin.

According to the facts ascertained on the benzoylation of oxy-amino acids by Sørensen and Andersen (1908), benzoyl group is always introduced to both amino and oxy groups of oxy-amino acid by the action of benzoylchloride in a neutral or very slightly alkaline solution, but in the alkaline solution, namely, $N/2$ NaOH solution, only the amino group is benzoylated by benzoylchloride.

Now 3.35 gm. of canalin was dissolved in 25 cc. of $N/2$ NaOH solution and benzoylated by means of 28 gm. of benzoylchloride, maintaining the medium at exactly a half normal alkalinity by caustic soda. Benzoyl canalin thus obtained was treated with enough ligroin and recrystallized from its alkaline solution on being slowly acidified by HCl.

It melts at $95-98^{\circ}$, is soluble in alcohol and slightly soluble in cold water, and its aqueous solution is acid to congo red. On drying it at 78° *in vacuo*, 9.8 per cent of its total weight was lost.

$C_4H_8O_3N_2(C_6H_5CO)_2 \cdot 2H_2O$ calculated. H_2O 10.53

Analysis

3.788 mg. substance: 0.263 cc. N at 20° and 772 mm.

$C_4H_8O_3N_2(C_6H_5CO)_2$ calculated N 8.19

found. „ 8.06

On the other hand, dibenzoylcanalin as above mentioned is resistant to the catalytic hydrogenation differing from the free canalin; that is, the easily reducible non-amino nitrogen of canalin is considered as stabilized by being benzoylated. From these facts, of the two benzoyl groups in dibenzoylcanalin, one is considered to combine with its amino nitrogen and the other with its non-amino nitrogen. If therefore the free γ -oxy group is present in the molecule of canalin, it must be still free in this dibenzoyl derivative. Accordingly this dibenzoylcanalin was allowed to stand for a few hours at 50° in the hydrochloric acid solution. It did not, however, undergo any change; that is, no lactone formation was observed.

When canalin was benzoylated by benzoyl chloride in the

neutral medium after the method used by Sørensen and Andersen, then just the same dibenzoylcanalin was obtained as in the case of the alkaline benzoylation. Judging also from the benzoylation product, there is no evidence of the presence of hydroxyl group in the molecule of canalin itself.

Dibenzoylcanalin lactam.

For the purpose of verifying the above conclusion, we made dibenzoylcanalin undergo acetylation by the usual method. If the hydroxyl group is present in dibenzoylcanalin, acetyl-dibenzoylcanalin should be synthesized by means of acetylation.

6 gm. of acetic anhydride containing three drops of conc. H_2SO_4 were added to 1.5 gm. of dibenzoylcanalin dissolved in 6 cc. of glacial acetic acid, drop by drop, during cooling and allowed to stand overnight in the ice box. Then from the reaction mixture the crystals in needles were obtained with a small amount of the unchanged dibenzoylcanalin. The former were recrystallized from hot absolute alcohol.

It melts at $163\text{--}164^\circ$ sharply, is soluble in hot alcohol and soluble with difficulty in water or cold alcohol, and its aqueous solution is quite neutral to litmus. It crystallizes in lustrous needles from the alcoholic solution.

Analysis

dried at 100° *in vacuo*. (no water of crystallization was observed)

4.273 mg. substance: 10.435 mg. CO_2 and 1.859 mg. H_2O

6.038 „ „ : 0.449 cc. N at 19.5° and 765 mm.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})_2$ calculated. C 66.65, H 4.98, N 8.64

found. „ 66.60, „ 4.87, „ 8.56

On treating dibenzoylcanalin with acetylchloride and BaCO_3 in the ethereal solution even in neutral reaction, also, the same compound as above described was obtained. In all cases of acetylations no acetyl derivative was detected.

This neutral derivative is considered to be a compound of a kind similar to 4-methyl-2-phenyl oxazolone, $\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{C}\equiv\text{N} \\ | \\ \text{O}-\text{CO} \end{array} \rangle \text{CH}\cdot\text{CH}_3$,

which has been obtained by Mohr and Stroschein (1909) from benzoylalanine by the action of acetic anhydride, but it can not be lactone, because dibenzoylcanalin does not undergo any change even on warming enough in the mineral acid solution. Also from this result of acetylation, the presence of γ -hydroxyl group in canalin is not conceivable.

III. Canalin ethyl ester hydrochloride.

Canalin suspended in absolute ethyl alcohol was sufficiently saturated with dry HCl gas and the solution was condensed into dryness at 25° . This treatment was repeated several times and at last the product obtained was recrystallized from the alcoholic solution.

It decomposes at $172-173^{\circ}$, is easily soluble in water, and its aqueous solution is acid to congo red.

Analysis

dried at 100° *in vacuo*.

4.917 mg. substance: 5.555 mg. CO_2 and 3.000 mg. H_2O

8.762 „ „ : 0.888 cc. N at 20.3° and 760 mm.

0.0231 gm. „ : 0.0287 gm. AgCl

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$

{ calculated. C 30.63, H 6.86, N 11.92, Cl 30.17

{ found. C 30.81, H 6.83, N 11.56, Cl 30.37

SUMMARY.

Summarizing the foregoing results, we make an attempt at the discussion on the constitution of canalin.

Canalin liberates its non-amino nitrogen, which is not detected by either Van Slyke's or the formol methods, as ammonia on absorbing two atoms of hydrogen at reduction, and thereafter first set free γ -hydroxyl group to convert to α -amino- γ -oxy butyric acid. In other words, in the molecule of canalin originally non-amino nitrogen is considered as combined in some form with the oxygen, which gives γ -hydroxyl group on reduction. So far as has been found in the literature on the subject, such a substance

can only be the α -derivative of hydroxylamine, which contains some group consisting of a direct combination of nitrogen and oxygen and readily yields ammonia on reduction, thereafter causing hydroxyl group, for example, α -benzyl hydroxylamine, $C_6H_5CH_2ONH_2$, converting into benzylalcohol and ammonia on reduction, as reported by v. Meyer (1883).

Some homologues of *o*-hydroxylamino fatty acids, $RCH(OH_2)COOH$, have already been synthesized by Werner and his pupils (1893-1896), and the properties of such a *o*-hydroxylamino group, H_2NO -, namely, its non-reducing property in Fehling's solution differing from *N*-derivative of hydroxylamine, its being neutral in reaction, but forming salt with acid, and its combining easily with benzoyl group, etc., are never contradictory to those of canalin, if *o*-hydroxylamino group is considered as contained in canalin. From the above considerations we suggest canalin to be an *o*-derivative of hydroxylamine and we accordingly propose as its constitutional formula $CH_2(OH_2) \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$, which of course should be more certainly ascertained by its synthesis.

LITERATURES.

- Jaffe, M. (1877): Ber., **10**, 1928.
Kitagawa, M. and Yamada, H. (1932): Jour. Biochem., **16**, 339.
Meyer, v. (1883): Ber., **16**, 167.
Mohr, E. and Stroschein, F. (1909): Ber., **42**, 2521.
Schulze, E. and Winterstein, E. (1902): Z. physiol. Chem., **34**, 130.
Sörensen, S. P. L. and Andersen, A. C. (1908): Z. physiol. Chem., **56**, 273.
Werner, A. (1893): Ber., **26**, 1567.
Werner, A. and Falck, R. (1896): Ber., **29**, 2658.

檢

印



Contents

No. 2, September, 1933.

MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of seed germination with particular reference to <i>zea mays</i>	173
MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of the wheat plant	199
URAKI, Ziro. Bedeutung über Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXIX. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Gewebsoxydation und auf die Kohlenhydratverbrennung	207
KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Cholesterinbestimmung im Blut. I. Kritische Bemerkungen über einige Extraktionsmethoden und eine vereinfachte gravimetrische Bestimmungsmethode	227
KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Cholesterinbestimmung im Blut. II. Über die Kombination der kolorimetrischen mit der Digitoninmethode	237
MIZUSAWA, Hitoshi. Beiträge zur Kenntnis der Alkoholoxydase	243
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. I. A micromethod of determination of menthol-, borneol- and β -naphthol-glucuronic acid in blood	259
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. II. A microcolorimetric method of determination of free and conjugated methol in blood and tissues	277
TOMIYAMA, Tetuo. Studies on the stick antimony electrode. I. The degree of stability of electrode potential and its effect on the relation between pH and E.M.F.	285
NOMURA, Kentaro. Some notes on the calomel electrode	301
YAMASAKI, Kazumi. Beiträge zur Kenntnis der Hammarstensen'schen reaktion der Cholsäure	311
YAMASAKI, Kazumi. Vorkommen der Taurocholsäure in der Hühnergalle	323
SMORODINZEW und ADOWA, A. N. Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und Kollagen	325
KITAGAWA, Matsunosuke and MONOBE, Shin-ichi. Studies on a diamino acid, canavanin. III. The constitution of canalin	333